

**Neue potentielle NIR-Fluoreszenzfarbstoffe zur
optischen Bildgebung: Charakter, Stabilität und
Zytotoxizität**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich–Schiller–Universität Jena

von Romy Haag
geboren am 19.09.1977 in Sonneberg

Gutachter

1.
2.
3.

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Abkürzungsverzeichnis

A_{max}	A bsorptions m aximum
CT	C omputertomographie
DAPI	4-6- D iamidino-2- p henylindol-di-hydrochlorid
DNA	d esoxyribonucleic a cid (Desoxyribonukleinsäure)
DOT	d iffuse o ptische T omographie
DMEM	D ulbecco's M odified E agle M edium
DMSO	D imethyl s ulfoxid
EC₅₀	median e ffective c oncentration (diejenige Dosis, bei der innerhalb eines festgelegten Zeitraumes 50 % der Zellen einen bestimmten Effekt zeigen)
EDTA	e thylene d iamine t etraacetic a cid (Äthylendiamintetraessigsäure)
E_{max}	E missions m aximum
FACS	F luorescence A ctivated C ell S orter
FKS	f etales K älberserum
HPLC	h igh p ressure l iquid c hromatography (Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie)
HSA	h umanes S erum a lbumin
ICG	I ndocyanin g rün
LD₅₀	median l ethal d ose (diejenige Dosis, bei der 50 % der Tiere eines Kollektivs sterben)
LDL	l ow d ensity l ipoproteins (Lipoproteine geringer Dichte)
MG	M olekulargewicht
MHC	m ajor h istocompatibility c omplex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MRT	M agnetresonanztomographie
MTT	M ethyl- T etrazolium- T est
MW	M ittelwert
NIR	N ah- I nfrarot
PES	P henazin- E thosulfat
PDT	p hotodynamische T herapie
PBS	p hosphate b uffered s aline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
SD	S tandard a bweichung
VCAM	v ascular c ell a dhesion m olecule

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Fluoreszierende Farbstoffe in der medizinischen Diagnostik.....	3
2.2	Die klinische Etablierung von Indocyaningrün	3
2.3	Die Entwicklung der optischen Bildgebung mit Licht im Nah-Infrarot-Bereich	4
2.4	Limitationen des klinischen Einsatzes von Indocyaningrün	5
2.5	Neue Fluoreszenzfarbstoffe zur optischen Bildgebung im Nah-Infrarot-Bereich	7
2.6	Ziele der Arbeit	9
3	Material und Methode	12
3.1	Material	12
3.1.1	Substanzen	12
3.1.2	Arbeitsutensilien	13
3.1.3	Geräte	14
3.1.4	Zelllinien	16
3.1.5	NIR-Fluoreszenzfarbstoffe	18
3.2	Methode	22
3.2.1	Stabilität der NIR-Fluoreszenzfarbstoffe in Lösung	22
3.2.2	Zellkultur	23
3.2.3	Rahmenbedingungen der Zytotoxizitätsversuche	27
3.2.4	Zytotoxizität der NIR-Fluoreszenzfarbstoffe	29
4	Ergebnisse	34
4.1	Stabilität der NIR-Fluoreszenzfarbstoffe	34
4.1.1	Stabilität von Indocyaningrün	35
4.1.2	Stabilität der DY-Farbstoffe	36
4.1.3	Stabilität von CY 5.5	39
4.1.4	Stabilität der S-Farbstoffe	39
4.2	Zellkultur - DAPI-Test	41

4.3	Rahmenbedingungen der Zytotoxizitätsversuche	
	Ermittlung geeigneter Aussaatzellzahlen	43
4.4	Zytotoxizität der NIR-Fluoreszenzfarbstoffe	45
4.4.1	Eigenabsorption der NIR-Fluoreszenzfarbstoffe	45
4.4.2	Ergebnisse der Zytotoxizitätsversuche	46
5	Diskussion	61
5.1	Stabilität der NIR-Fluoreszenzfarbstoffe in Lösung	61
5.1.1	Stabilität von Indocyaningrün	62
5.1.2	Stabilität der DY-Farbstoffe	65
5.1.3	Stabilität von CY 5.5	66
5.1.4	Stabilität der S-Farbstoffe	67
5.1.5	Fazit aus den Stabilitätsversuchen der NIR-Farbstoffe	69
5.2	Rahmenbedingungen der Zytotoxizitätsversuche	
	Ermittlung geeigneter Aussaatzellzahlen	70
5.3	Zytotoxizität der NIR-Fluoreszenzfarbstoffe	71
5.3.1	Zytotoxizität von Indocyaningrün	72
5.3.2	Zytotoxizität der DY-Farbstoffe	75
5.3.3	Zytotoxizität der S-Farbstoffe	77
6	Schlussfolgerungen	81
7	Literaturverzeichnis	83
8	Danksagung	95

1 Zusammenfassung

Seit seiner Einführung im Jahre 1956 hat sich der Fluoreszenzfarbstoff Indocyaningrün (ICG) in den verschiedensten Bereichen der Medizin etabliert. Seine klinischen Anwendungsgebiete reichen von der Kardiologie bis hin zur Ophthalmologie. In den letzten Jahren wurde der Cyaninfarbstoff auf Grund seiner optischen Eigenschaften zudem vermehrt in der diagnostischen Radiologie eingesetzt. Die Eignung des ICG zur optischen Bildgebung im Nah-Infrarot (NIR)-Bereich konnte beispielsweise in Verfahren wie der diffusen optischen Tomographie (DOT) gezeigt werden.

Das hohe Interesse an spezifischen und selektiven bildgebenden Methoden führte im Laufe der Zeit nicht nur zu technischen Verbesserungen auf dem Gebiet der optischen Bildgebung, sondern auch zur Entwicklung einer Vielzahl neuer NIR-Fluorochrome. Die hier untersuchten Vertreter der DY-Serie, S-Serie und CY-Serie sind Cyaninfarbstoffe auf Polymethin-Basis, die sich im Vergleich zu ICG durch verbesserte fluoro-optische, chemische und thermische Eigenschaften auszeichnen. Auf Grund dieser Merkmale haben sie ein hohes Potential für eine Anwendung in der optischen Bildgebung. Der Einsatz setzt allerdings grundlegend voraus, dass die NIR-Farbstoffe in biologischen Medien stabil sind und eine zytotoxische Wirkung der Substanzen auf das biologische Umfeld ausgeschlossen werden kann. Dies sollte erstmals in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Das erste Ziel der vorliegenden *in vitro* Studie war deshalb, das Verhalten der Fluorochrome in wässrigen Lösungen zu untersuchen. Die Messung der Absorption bei Wellenlängen zwischen 450 nm und 900 nm und die Bestimmung der relativen Peakhöhe des Absorptionsmaximums ermöglichte eine Beurteilung der Stabilität der neuen Fluoreszenzfarbstoffe im Vergleich zu Indocyaningrün über einen festgelegten Versuchszeitraum. Um den Einfluss des Lösungsmittels und der Temperatur auf die Farbstoffstabilität zu überprüfen, wurden 10 µM Lösungen in Phosphat gepufferter Salzlösung und Kulturmedium mit 10 % fetalem Kälberserum hergestellt und bei 4 °C bzw. 37 °C für 72 Stunden aufbewahrt. Die Messung der Absorption (450 – 900 nm) erfolgte nach 0, 24, 48 und 72 Stunden. Die Versuche in Kulturmedium bei 37 °C waren dabei von besonderem Interesse, da sie eine Aussage über das Verhalten der Fluorochrome unter *in vivo* nahen Bedingungen möglich machten.

Indocyaningrün zeigte innerhalb des Messzeitraumes in Kulturmedium bei 4 °C und 37 °C einen Rückgang der relativen Peakhöhe um $14 \pm 8 \%$ bzw. $8 \pm 4 \%$. In Puffer konnte nach 72 Stunden ein deutlicher Abfall des Absorptionsmaximums um $50 \pm 7 \%$ bei 4 °C bzw. $67 \pm 10 \%$ bei 37 °C nachgewiesen werden. Die DY-Farbstoffe und die Fluorochrome S 0121 und CY 5.5 waren unter allen experimentellen Rahmenbedingungen, S 0306 in Kulturmedium stabiler als ICG. In Puffer fiel der S-Farbstoff sowohl bei 4 °C als auch bei 37 °C innerhalb von 24 Stunden aus.

Als zweites Ziel dieser Studie wurde der Effekt der neuen Fluoreszenzfarbstoffe und des ICG auf die Vitalität von Endothelzellen (SVEC 4-10-Zelllinie) und Makrophagen (J 774-Zelllinie) untersucht. Die Zellen wurden dafür mit dem jeweiligen Farbstoff in Konzentrationen von 0,5 µM bis 100 µM für 24, 48 und 72 Stunden unter Standardbedingungen (5 % CO₂, 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Die zellschädigende Wirkung der Fluorochrome konnte anschließend durch die Bestimmung der Aktivität zellulärer Dehydrogenasen in den Versuchsansätzen erfasst werden (Methyl-Tetrazolium-Test). Diese ist proportional zu dem Anteil lebender Zellen in einer Population. Die Behandlung der Endothelzellen mit Indocyaningrün führte in hohen Konzentrationen (> 20 µM) unabhängig von der Inkubationszeit zu einer nachweisbaren Abnahme der Zellvitalität (max. $40 \pm 3 \%$). Bei den Makrophagen wurde schon ab einer Konzentration von 10 µM ein starker und tendenziell zeitabhängiger Rückgang des Anteils lebender Zellen in der Population beobachtet (max. $93 \pm 4 \%$). Im Gegensatz dazu war bei den DY-Farbstoffen eine weitaus geringere Zytotoxizität feststellbar. Die Inkubation der Zellen mit S 0121 führte in Abhängigkeit von der Zeit lediglich in der höchsten getesteten Konzentration (100 µM) zu einer Abnahme der Vitalität der Endothelzellen (max. $37 \pm 8 \%$) und der Makrophagen (max. $89 \pm 5 \%$). Der Farbstoff S 0306 verursachte von allen getesteten Fluorochromen den stärksten konzentrationsabhängigen Abfall der Vitalität der untersuchten Zelllinien. Im Bereich von 10 µM bis 100 µM lag der Rückgang der Zahl lebender Zellen im Ansatz häufig bei über 90 %.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die hier getesteten neuen NIR-Farbstoffe bis auf das Fluorochrom S 0306 eine geringere zytotoxische Wirkung auf die untersuchten Zelllinien haben und in biologischen Medien stabiler sind als das klinisch bereits zugelassene Indocyaningrün. Für die optische Bildgebung stellen sie somit eine vielversprechende Alternative zum ICG dar. Die vorliegende *in vitro* Studie ist der erste Schritt in Richtung einer zukünftigen klinischen Anwendung der Fluoreszenzfarbstoffe, die durch weiterführende Untersuchungen realisiert werden könnte.

2 Einleitung

2.1 Fluoreszierende Farbstoffe in der medizinischen Diagnostik

Fluoreszierende Farbstoffe werden in der Bioanalytik und in der Medizin in vielfältiger Weise eingesetzt. Auf dem Gebiet der medizinischen Diagnostik liefern sie in Verbindung mit speziellen Bildgebungsverfahren in ersten Ansätzen wichtige Informationen über den Aufbau und die Funktion von Geweben bzw. biologischen Strukturen. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, krankheitsbedingte Veränderungen frühzeitig *nicht invasiv* zu erkennen und rechtzeitig zu therapieren. Hinzu kommt, dass der Erfolg der therapeutischen Maßnahmen bereits kurz nach Therapiebeginn dargestellt, eingeschätzt und gegebenenfalls modifiziert werden kann (Weissleder & Mahmood, 2001). Insbesondere die Gruppe der Cyaninfarbstoffe hat sich dabei bisher als günstig für die experimentelle und klinische Anwendung erwiesen (Bremer et al., 2001).

2.2 Die klinische Etablierung von Indocyaningrün

Einer der ersten klinisch eingesetzten Cyaninfarbstoffe war das Indocyaningrün (ICG). Der hydrophile, anionische Tricarbocyanin-Farbstoff wurde von Heseltine und Brooker (Brooker, 1955; Fox et al., 1957) in den Kodak Research Laboratories entwickelt und erstmals 1956 vorgestellt (Fox et al., 1956).

Seit seiner Einführung hat sich die Anwendung des Fluoreszenzfarbstoffes in den verschiedensten Gebieten der Medizin etabliert. In der Kardiologie wird Indocyaningrün zur Bestimmung des Plasmavolumens (Bradley & Barr, 1968) und zur Messung des Herz-Zeit-Volumens eingesetzt (Klocke et al., 1968). Schon seit mehr als 30 Jahren kommt der Farbstoff in der Augenheilkunde bei der angiographischen Darstellung der choroidalen und retinalen Vaskularisierung zum Einsatz (Benson & Kues, 1978). Auch zur Überprüfung der exkretorischen Leberfunktion (Leevy et al., 1967) und in pharmako-kinetischen Untersuchungen (Aubrecht & Perlik, 1990) wird er angewandt.

Neueren Studien zufolge wird das ICG auf Grund seiner photo-dynamischen Eigenschaften sowohl *in vitro* (Fickweiler et al., 1997; Bäuml et al., 1999) als auch *in vivo* (Abels et al., 1998) zur photo-oxidativen Schädigung von Tumorzellen in der photo-dynamischen Therapie (PDT) erprobt. Die PDT ist eine Behandlungsmodalität für Erkrankungen, die durch Hyperproliferation und Neovaskularisierung gekennzeichnet sind. Dabei wird ein intravenös verabreichter Photosensibilisator (zum Beispiel Indocyaningrün) durch Laserlicht einer geeigneten Wellenlänge bestrahlt und so aktiviert. Durch die Aktivierung ablaufende chemische Prozesse führen zur Generierung von Singulett-Sauerstoff (reaktive Sauerstoffspezies), der die Zerstörung biologischer Zielmoleküle auslösen kann (Szeimies, 1994-1997).

2.3 Die Entwicklung der optischen Bildgebung mit Licht im Nah-Infrarot-Bereich

In den letzten Jahren eröffnete sich auf dem Gebiet der diagnostischen Radiologie eine weitere Einsatzmöglichkeit für den Fluoreszenzfarbstoff Indocyaningrün. Im Zuge der fortschreitenden Entwicklung der sogenannten optischen Bildgebung konnte das Fluorochrom auf Grund seiner optischen Eigenschaften speziell für die Diagnostik mit Licht im Nah-Infrarot-Bereich (700 – 1000 nm) genutzt werden. Die NIR-Diagnostik hat gegenüber anderen optischen bildgebenden Verfahren nennenswerte Vorteile in der Darstellung von patho-physiologischen Zuständen und Prozessen (Mahmood et al., 1999). Sichtbares Licht penetriert das Gewebe nur wenige Millimeter (Bremer et al., 2001). Licht des NIR-Spektrums kann dagegen Eindringtiefen von mehreren Zentimetern erreichen. Ursache hierfür ist die geringe Absorption von Gewebe, Hämoglobin und Wasser im langwelligen Bereich, was auch als *diagnostisches Fenster* bezeichnet wird. Zusätzlich ist die Autofluoreszenz des Gewebes in dieser Region relativ gering und führt zu einer Kontrastverstärkung des Bildes (Lin et al., 2003). Die optische Bildgebung im Nah-Infrarot-Bereich stellt demzufolge eine vielversprechende diagnostische Methode dar, die es ermöglicht, tiefer liegende Strukturen nicht invasiv zu untersuchen (Intes et al., 2003). Stoffwechselfunktionen, Genexpressionsmuster und molekulare Veränderungen an Zellen sowie einzelnen Molekülen können so hochspezifisch detektiert und analysiert werden (Conrad, 2001).

Ein bereits klinisch eingesetztes bildgebendes Detektionssystem ist die diffuse optische Tomographie (DOT). Ihr liegt analog zu der Computertomographie (CT) eine Detektion von Photonenabsorptionen aus verschiedenen Projektionsrichtungen zu Grunde. Die DOT liefert im Gegensatz zu anderen optischen Verfahren nach Kontrastmittelgabe eine dreidimensionale Quantifizierung der Absorption und Streuung von Photonen im Gewebe bei gleichzeitig hoher Ortsauflösung. Somit ist eine nicht invasive Quantifizierung von intrinsischen oder extrinsischen Absorbern möglich (Bremer et al., 2001). Infolgedessen können Rückschlüsse auf die Anwesenheit von Oxy- und Deoxyhämoglobin im Gewebe, die Sauerstoffsättigung des Blutes (Sevick et al., 1991) und die Aufnahme der fluoreszierenden, signalgebenden Substanz durch biologische Strukturen gezogen werden (Beauvoit et al., 1994). In der Praxis spielt die diffuse optische Tomographie eine große Rolle bei der Funktionsmessung von Organen und Geweben (Villringer & Chance, 1997; Nioka et al., 1998) und der Auffindung von Hämatomen (Gopinath et al., 1993). Besondere Bedeutung hat sie außerdem in der Tumordiagnostik, wo sie zur Beurteilung des Metabolismus, der Angiogenese und der Permeabilität von Geweben eingesetzt wird (Horak et al., 1992; Vaupel et al., 1997; Vaupel et al., 1998). In diesem Zusammenhang beschreibt eine Studie von Ntziachristos et al. (2000) die Anwendung einer mit ICG verstärkten, diffusen optischen Tomographie zur Detektion von Mammatumoren im Menschen. Die Auswertung der DOT ergab vergleichbare Ergebnisse zu einer parallel dazu durchgeführten Magnetresonanztomographie (MRT) und zeigte die potentielle Möglichkeit der Tumordetektion und Tumordarstellung mit Hilfe von Indocyaningrün.

2.4 Limitationen des klinischen Einsatzes von Indocyaningrün

Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse ist der Einsatz des Indocyaningrüns in der optischen Bildgebung auf Grund mehrerer Faktoren limitiert.

Zum einen ist bekannt, dass die Stabilität des Fluoreszenzfarbstoffes in wässrigem Milieu ungenügend ist und stark von äußeren Bedingungen abhängt (Gathje et al., 1970; Landsman et al., 1976). In Lösung kommt es durch Aggregation der Farbstoffmoleküle (Zhou et al., 1994) zu physiko-chemischen Veränderungen und letztendlich zum irreversiblen Verfall des Indocyaningrüns (Hollins et al., 1987). Die Folgen sind eine

verminderte Lichtabsorption und Emission sowie eine Verschiebung der Wellenlänge des Absorptionsmaximums (Landsman et al., 1976).

Zum anderen bindet ICG fast vollständig an Plasmaproteine des Blutes (Muckle, 1976). Nach intravenöser Gabe erfolgt eine schnelle Aufnahme des Farbstoffes durch die Leber und eine rasche hepato-biliäre Ausscheidung (Meijer et al., 1988). Die kurze Plasma-Halbwertszeit führt dazu, dass beispielsweise eine Detektion von Tumorgewebe mit Indocyaningrün nur für einen kurzen Zeitraum nach intravenöser Gabe möglich ist. Dieser Sachverhalt ist besonders bei der Beurteilung von tiefer liegenden Geweben von Nachteil (Licha et al., 2000).

Obwohl ICG bereits klinisch zugelassen ist, finden sich zudem Literaturangaben, die ein zytotoxisches Potential des Farbstoffes beschreiben. In der Augenheilkunde sind zeit- und konzentrationsabhängige Effekte von Indocyaningrün auf humane Epithelzellen des Auges dokumentiert (Ho et al., 2003). In Experimenten von Lee et al. (2003) zeigten sich nach Farbstoffbehandlung degenerative Veränderungen der äußeren Retina des Kaninchenauges. Eine zellschädigende Wirkung wurde ebenfalls in Versuchen von Fickweiler et al. (1997) an einer Keratinozytenzelllinie beobachtet. Auch hier war die Zytotoxizität von Indocyaningrün abhängig von der Inkubationszeit und der Farbstoffkonzentration. Der LD₅₀-Wert des Fluoreszenzfarbstoffes ist bei Mäusen mit 50 - 80 mg/kg angegeben (Lutty, 1978). Für die Anwendung im Menschen liegt die empfohlene maximal verträgliche Dosis für die intravenöse Gabe des Farbstoffes bei 5 mg/kg (Gandorfer et al., 2003).

Ein weiterer limitierender Faktor für einen Einsatz des Fluorochroms in der optischen Bildgebung ist außerdem, dass Indocyaningrün auf Grund seiner chemischen Struktur nicht spezifisch an Biomoleküle wie Peptide und Proteine gebunden werden kann (Moody et al., 1999; Lehmann, persönliche Mitteilung). Die kovalente Bindung eines fluoreszierenden Farbstoffes zum Beispiel an einen makromolekularen Rezeptorliganden macht ein gezieltes Auffinden und die systematische Darstellung von Geweben möglich (*spezifisches Targeting*). Im Gegensatz zu einer unspezifischen Bindung erlaubt die hohe Selektivität und Affinität solcher Liganden die Verwendung geringer (nanomolarer) Farbstoffdosen und resultiert außerdem in einem hohen Verhältnis der Signalintensität von Zielregion und benachbartem Gewebe (Becker et al., 2001).

2.5 Neue Fluoreszenzfarbstoffe zur optischen Bildgebung im Nah-Infrarot-Bereich

Durch das hohe Interesse an spezifischen und selektiven bildgebenden Verfahren besonders in der klinischen Tumordiagnostik und deren großes Potential für zukünftige experimentelle und klinische Anwendungen kam es in den letzten Jahren neben technischen Verbesserungen auch zu Neu- und Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der NIR-Fluoreszenzfarbstoffe (Bremer et al., 2001).

Eine breite Anwendung in tierexperimentellen Studien fand bisher beispielsweise das vom Indocyaningrün abgeleitete Fluorchrom CY 5.5 (Ballou et al., 1995; Mahmood et al., 1999; Weissleder et al., 1999; Hansch et al., 2004). Dieser Cyaninfarbstoff auf Polymethin-Basis hat gegenüber ICG unter anderem den Vorteil, dass er auf Grund seiner chemischen Struktur (NHS-Ester) kovalent an verschiedenste Biomoleküle gebunden und so als signalgebender Bestandteil optischer Sonden eingesetzt werden kann (Oswald et al., 1999; Amersham, 2003).

Die ersten *in vivo* erprobten optischen Sonden zur Tumordiagnostik waren monoklonale Antikörper verknüpft mit einem fluoreszierenden Cyaninfarbstoff. Durch die Bindung der Antikörper an für sie spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche von Tumorzellen kann das jeweilige Fluorchrom (zum Beispiel CY 5.5) gezielt an den gewünschten Wirkort gelangen (Ballou et al., 1995).

Eine vielversprechende Weiterentwicklung war die von Weissleder et al. (1999) vorgestellten sogenannten „intelligenten“ NIR-Fluoreszenzfarbstoffe, zu denen auch die Gruppe der protease-sensitiven Farbstoffe gehört. Innerhalb einer solchen „intelligenten“ optischen Sonde, bestehend aus Fluoreszenzfarbstoff und makromolekularem Träger, kommt es durch die räumliche Nähe der eingeschlossenen Fluorochrome zueinander zu einer gegenseitigen Signalauslöschung (= quenching). Erst durch eine enzym-induzierte Konformationsänderung des Moleküls und der damit verbundenen Freisetzung der Fluorochrome (= dequenching) lässt sich ein optisches Signal detektieren und spezifische Enzymaktivitäten mit hoher Sensitivität *in vivo* darstellen. Dies ist insofern von Interesse, als dass eine Vielzahl maligner Tumoren eine deutliche

Überexpression verschiedenster Proteasen aufweist und die proteolytische Aktivität von Tumoren einen wichtigen prognostischen Faktor für Tumorerkrankungen darstellt (Bremer et al., 2001).

Im Bestreben die bereits erreichte hohe Sensitivität und Selektivität der „intelligenten“ optischen Sonden noch weiter zu verbessern, wurden die Fluoreszenzfarbstoffe unter anderem über Peptidsequenzen an makromolekulare Träger gekoppelt. Die Peptide stellen Erkennungsmotive für spezifische Enzyme, wie zum Beispiel die Endopeptidase Cathepsin D, dar. Wie Versuche von Tung et al. (1999) zeigten, führt die Spaltung der Peptidsequenzen der „intelligenten“ optischen Sonde durch Cathepsin D zur Aktivierung des Fluorochroms und damit zur Freisetzung eines deutlichen Fluoreszenzsignals.

Mit der DY-Serie (Dyomics GmbH, Jena) wurden neue, einfach zu synthetisierende Cyaninfarbstoffe auf Polymethin-Basis mit hoher Fluoreszenzausbeute und einer hohen photo-chemischen sowie thermischen Stabilität entwickelt. Modifiziert mit in der Bioanalytik üblichen reaktiven Gruppen, zum Beispiel NHS-Estern, zeichnen sie sich durch eine hohe Kopplungseffizienz aus, so dass bei Biomolekülen mit mehreren Bindestellen wie Proteinen, ein gut reproduzierbares Farbstoff/Protein-Verhältnis einstellbar ist (Czerney et al., 2001). Auf Grund dieser Eigenschaften haben sie ein großes Potential als signalgebender Bestandteil optischer Sonden und damit zur Markierung von organischen und anorganischen Mikropartikeln in verschiedensten optischen, insbesondere fluoreszenz-optischen, Bestimmungs- und Nachweisverfahren eingesetzt zu werden (DOS 100 25 820 A1, 2000).

Die Farbstoffe der S-Serie (FEW Chemicals GmbH, Wolfen) sind ebenfalls modifizierte Cyaninfarbstoffe, die sich neben ähnlichen Absorptionseigenschaften wie ICG durch eine höhere thermische Stabilität auszeichnen (Mustroph, persönliche Mitteilung).

2.6 Ziele der Arbeit

Die optische Bildgebung mit Licht im Nah-Infrarot-Bereich (700 - 1000 nm) hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Parallel zu technischen Fortschritten ermöglicht eine Vielzahl von fluoreszierenden Farbstoffen, insbesondere Cyaninfarbstoffen, eine sensitive Detektion molekularer Ziele *in vivo* (Bremer et al., 2001). Indocyaningrün wird als optisches Kontrastmittel schon lange in den unterschiedlichsten klinischen Bereichen (Leevy et al., 1967; Bradley & Barr, 1968; Klocke et al., 1968; Benson & Kues, 1978) und mittlerweile auch auf dem Gebiet der NIR-Diagnostik (Haglund et al., 1996; Ntziachristos et al., 2000; Intes et al., 2003) eingesetzt.

Eine Anwendung der hier untersuchten neuen Cyaninfarbstoffe in der optischen Bildgebung wird auf Grund ihrer im Vergleich zum Indocyaningrün verbesserten chemischen und optischen Eigenschaften angestrebt. Weitere vorteilhafte Merkmale wie die Bindungsfähigkeit einiger Farbstoffe an makromolekulare Biomoleküle wie beispielsweise Antikörper oder spezielle Trägermoleküle könnten schon in niedrigen Dosen die spezifische Detektion und Darstellung einer gewünschten Zielregion *in vivo* (*spezifisches Targeting*) ermöglichen. Nach bestem Wissen liegen im Gegensatz zum Indocyaningrün bisher noch keine systematischen Daten über Wechselwirkungen der NIR-Fluorochrome mit biologischen Systemen vor. Die erstmaligen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur Stabilität der Farbstoffe in biologischen Medien und der Zytotoxizität *in vitro* sollen die bestehenden Datenlücken so weit wie möglich schließen. Sind die Fluorochrome stabil und biologisch unbedenklich, erfüllen sie entscheidende Voraussetzungen für einen zukünftigen Einsatz als optische Kontrastmittel. Die hier vorgelegte Studie wäre damit gegebenenfalls ein erster Schritt auf dem Weg zu einer langfristigen klinischen Zulassung der neuen Farbstoffe.

Ein Ziel dieser Arbeit ist daher, die Stabilität von Vertretern der DY-Serie (DY-681, DY-731, DY-751, DY-776), S-Serie (S 0121, S 0306) und CY-Serie (CY 5.5) im Vergleich zu Indocyaningrün in biologischen Medien zu untersuchen. Eine hohe Stabilität in wässrigem Milieu ist Voraussetzung dafür, dass bei einer *in vivo* Anwendung der Fluorochrome alle Zielmoleküle und -gewebe erreicht werden und der diagnostische Einsatz nicht durch einen schnellen Verfall der Substanzen limitiert wird.

Das Verhalten der Fluoreszenzfarbstoffe wird sowohl in Phosphat gepufferter Salzlösung als auch in Kulturmedium mit 10 % fetalem Kälberserum bei 4 °C und 37 °C über 72 Stunden getestet. So ist es möglich, eine Abhängigkeit der Farbstoffstabilität vom Lösungsmittel, der Temperatur und der Zeit zu erfassen und darzustellen. Durch den proteinhaltigen Serumzusatz im Kulturmedium können die Auswirkungen anwesender Proteine auf das Verhalten der Farbstoffe beurteilt werden. In Hinblick auf eine potentielle diagnostische Anwendung der Fluorochrome sind speziell die Versuche in Kulturmedium bei 37 °C von Bedeutung, da die dort vorherrschenden experimentellen Bedingungen der potentiellen *in vivo* Situation sehr nahe kommen (Zusammensetzung, pH-Wert und Temperatur der Lösung). Untersuchungen im Bereich niedrigerer Temperaturen (4 °C) ermöglichen zusätzlich Aussagen über das zu erwartende Verhalten der Fluorochrome unter Lagerbedingungen.

Des Weiteren verfolgt die vorliegende Arbeit das Ziel, die Wirkung der neuentwickelten NIR-Fluoreszenzfarbstoffe der DY-Serie und der S-Serie auf die Zellvitalität *in vitro* zu untersuchen. Die Experimente dieser Arbeit sollen eventuell bestehende zytotoxische Tendenzen der Substanzen schon vor Durchführung reglementierter und teurer Tierversuche aufzeigen. Analog zu den Stabilitätsversuchen wird auch hier das Indocyaningrün als Referenzsubstanz mit untersucht.

Die Versuche werden an zwei ausgewählten zellulären Zielsystemen durchgeführt: Zum einen an Endothelzellen der SVEC 4-10-Zelllinie, da die gefäßauskleidenden Zellen als erste Kontakt zu intravenös verabreichten Fluorochromen haben, zum anderen soll die Zytotoxizität der NIR-Farbstoffe an Makrophagen (J 774-Zelllinie) untersucht werden. Dieser Zelltyp stellt durch seine Anwesenheit im Blut und im Gewebe ein weiteres potentielles Zielsystem der Farbstoffe bei einer *in vivo* Anwendung dar. Außerdem sind die zur Phagozytose befähigten Zellen durch die ablaufenden zellspezifischen Prozesse empfindliche Indikatoren, die toxische Einflüsse exogener Substanzen leicht erkennen lassen. Weiterhin erlaubt die Einbeziehung von zwei verschiedenen zellulären Systemen, mögliche Unterschiede in der Sensitivität der Zelltypen auf die Farbstoffbehandlung darzustellen und miteinander zu vergleichen. Der untersuchte Konzentrationsbereich der Farbstoffe von 0,5 µM bis 100 µM berücksichtigt einen in der Literatur gefundenen EC₅₀-Wert für ICG, der von Abels et al. (2000) im Rahmen einer photo-dynamischen Therapie bei 20 µM bestimmt

wurde. Das Spektrum schließt klinisch relevante Farbstoffkonzentrationen im niedrigen mikromolaren Bereich ein, aber auch Dosen oberhalb des Referenzwertes, um eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit der Zytotoxizität darzustellen. Da die neuen Farbstoffe noch nicht *in vivo* getestet wurden, wird für die *in vitro* Experimente dieser Arbeit ein relativ langer Versuchszeitraum von 72 Stunden festgelegt. Damit ist es möglich, eine Aussage über die Wirkung der Fluorochrome auf das biologische Zellmaterial über einen längeren Zeitraum zu treffen. Dies könnte für zukünftige *in vivo* Anwendungen von Bedeutung sein, da beispielsweise der Farbstoff CY 5.5 72 Stunden nach Injektion in Mäuse noch nachweisbar war (Weissleder et al., 1999). Zur Beurteilung der Lebensfähigkeit der Zellen nach Farbstoffbehandlung wird der einfache und zuverlässige Methyl-Tetrazolium-Test (MTT) der Firma Promega durchgeführt. Durch die Messung der Aktivität zellulärer mitochondrialer Dehydrogenasen kann ein direkter Rückschluss auf die Zellvitalität in einer Population gezogen werden (Mc Hale & Mc Hale, 1988) und macht so eine Einschätzung des zytotoxischen Potentials der neuen NIR-Fluorochrome möglich.

Zusammenfassend werden folgende Zielstellungen in der vorliegenden Studie bearbeitet:

1. Charakterisierung der getesteten neuen NIR-Fluoreszenzfarbstoffe und des Indocyaningrüns
2. Untersuchung der Stabilität der neuen NIR-Fluoreszenzfarbstoffe und des Indocyaningrüns in biologischen Medien
3. Festlegung geeigneter Rahmenbedingungen für die Zytotoxizitätsversuche
4. Untersuchung der Zytotoxizität der neuen NIR-Fluoreszenzfarbstoffe und des Indocyaningrüns an zwei ausgewählten Zielsystemen (SVEC 4-10-Zelllinie und J 774-Zelllinie)

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Substanzen

Substanzen	Hersteller
Aceton 99,8 %	Carl Roth GmbH & CO., Karlsruhe, Deutschland
Cell Titer 96 Aqueous One Solution Reagent	Promega Corporation, Madison, USA
DAPI (4-6-Diamidino-2-phenylindol-di- hydrochlorid)	Serva Elektrophoresis, Heidelberg, Deutschland
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 500 ml	GIBCO BRL Life Technologies Ltd., Paisley, Schottland
DMSO (Dimethylsulfoxid) 99,5 %	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ethanol 96 %	Fluka Chemie AG Buchs, Schweiz
FKS (fetales Kälberserum)	GIBCO BRL Life Technologies Ltd., Paisley, Schottland
Isopropanol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Methanol 99 %	Sigma Chemical CO., St. Louis MO, USA
PBS (phosphat buffered saline) pH 7,0 - 7,5, Konzentration: 1 M	GIBCO BRL Life Technologies Ltd., Paisley, Schottland
Trypanblau	Riedel-de Häen AG, Seelze, Deutschland
Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) 0,25 %	GIBCO BRL Life Technologies Ltd., Paisley, Schottland

3.1.2 Arbeitsutensilien

Arbeitsutensilien	Hersteller
Bechergläser (Größen: 50 ml, 100 ml, 200 ml und 500 ml)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Cell Scraper	Greiner Bio-one GmbH, Labortechnik, Solingen, Deutschland
Chamber Slide	Nalge NUNC International, Naperville, USA
Deckgläser	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Einfrierröhrchen	Simport Plastics, Quebec, Kanada
Falcontubes (Größen: 15 ml und 50 ml)	Greiner Bio-one GmbH, Labortechnik, Solingen, Deutschland
Glasmesspipetten Schellbach, Klasse A5, Hirschmann (Größen: 2 ml, 5 ml, 10 ml und 20 ml)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kulturflaschen-Cellstar (75 cm ²)	Greiner Bio-one GmbH, Labortechnik, Solingen, Deutschland
Kulturflaschen-Nunclon TM (75 cm ²)	Nalge Nunc International, Dänemark
Mikrotiterplatten (96 Well)	Greiner Bio-one GmbH, Labortechnik, Solingen, Deutschland
Mikrotiterplatten-Nunclon TM (96 Wells)	Nalge Nunc International, Dänemark
Pipettenspitzen (Größen: 10 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl und 1000 µl)	Greiner Bio-one GmbH, Labortechnik, Solingen, Deutschland
Präzisionsküvetten aus Quarzglas	Hellma GmbH, Müllheim-Baden, Deutschland
Reagenzgläser	Greiner Bio-one GmbH, Labortechnik, Solingen, Deutschland
Reagenzreservoir für Mehrkanalpipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
Reagiergefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Thoma-Zählkammer	Carl Roth GmbH & CO., Karlsruhe, Deutschland

3.1.3 Geräte

Geräte	Hersteller
Akku-Boy	Brand, Wertheim, Deutschland
Auswertungsprogramme	Sigma Plot 2001
Autoclav für Flüssigkeiten, Varioclav	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleissheim, Deutschland
Autoclav für Materialien, HVP-50	Hirayama Manufacturing Corporation, Japan
Brenner Vulcan	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Dampfsterilisator	Varioklav, H + P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Einfriergefäß	Qualilab, Bender & Hobein, USA
Eismaschine Ziegra	Dresdner Kühlanlagenbau, Dresden, Deutschland
Eppendorfpipetten (Größen: 10 – 100 µM, 50 - 200 µM, 100 - 1000 µM)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Feinwaage isocal	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Fotobearbeitungsprogramm	Adobe Photoshop 6.0
Inkubator Hera Safe	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Kurzzeitwecker	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland
Magnetrührer	IKA-Labortechnik GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mikroskop BX-50	Olympus, Hamburg, Deutschland
Phasenkontrastmikroskop Olympus CK 40	Olympus, Hamburg, Deutschland
Plattenphotometer SLT Spectra	SLT Labinstruments Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland

Reinraumwerkbank	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Spectrophotometer Ultrospec 4300 pro, UV visible	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Statistikprogramm	SPSS 11.5
Stickstofftonne Chronos	Messer Griesheim GmbH, Krefeld, Deutschland
Tiefkühltruhe (-80°C)	Scientific Equipment Group GmbH, Egelsbach, Deutschland
Transferpipette - 8	Brand, Wertheim, Deutschland
Trockenschrank	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Biofuge primo	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

3.1.4 Zelllinien

In den Zytotoxizitätsversuchen wurden 2 verschiedene Zelllinien als Zielsysteme untersucht.

3.1.4.1 SVEC 4-10-Zelllinie

Die in den Experimenten verwendeten SVEC 4-10-Zellen (American Type Culture Collection, Manassas, USA) sind endotheliale Zellen axillärer Lymphknotengefäße der Maus (Abb. 1). Die Zellen sind durch das SV-40 Virus transformiert (immortalisiert). Ihre ursprünglichen funktionellen und morphologischen Eigenschaften wurden dadurch jedoch nicht verändert. SVEC 4-10-Zellen exprimieren MHC 1, MHC 2, VCAM 1 und außerdem Rezeptoren mit hoher Affinität für LDL. Die Verdopplungsrate der Zelllinie liegt zwischen 24 und 36 Stunden (O'Connell & Edidin, 1990).

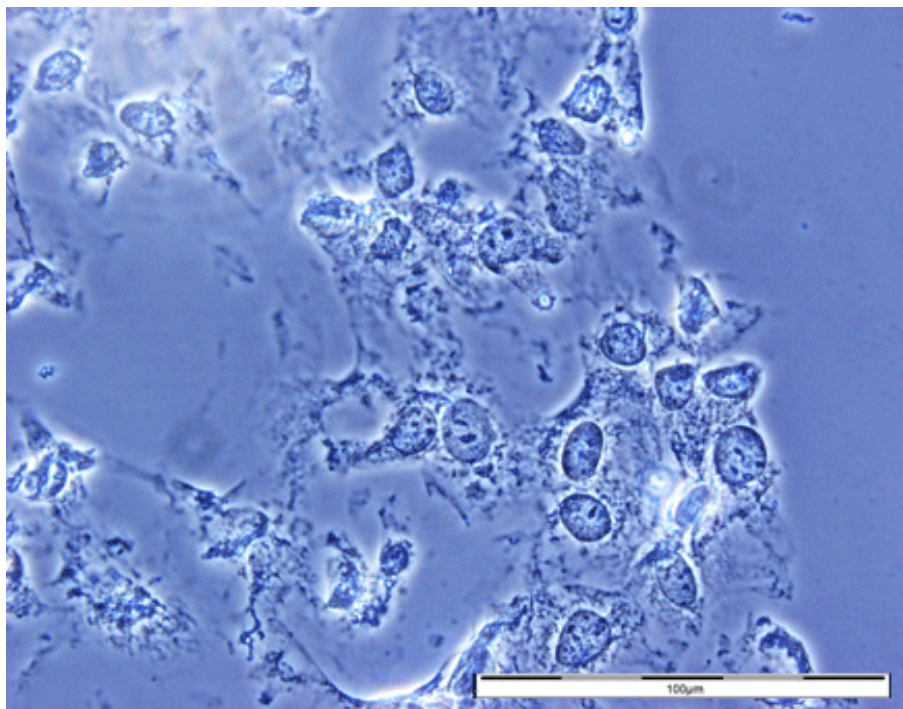


Abb. 1 Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme der SVEC 4-10-Zelllinie nach Fixierung mit Methanol und Aceton

3.1.4.2 J 774-Zelllinie

Die Makrophagen der J 774-Zelllinie (Cell Lines Services, Heidelberg, Deutschland) wurden aus der Muskulatur der Maus gewonnen (Abb. 2). Die Zellen wachsen adhärent und exprimieren auf ihrer Membranoberfläche unter anderem Rezeptoren für Antikörper und Komplementfaktoren. Sie sind zur Phagozytose befähigt (Ralph & Nakin, 1975).

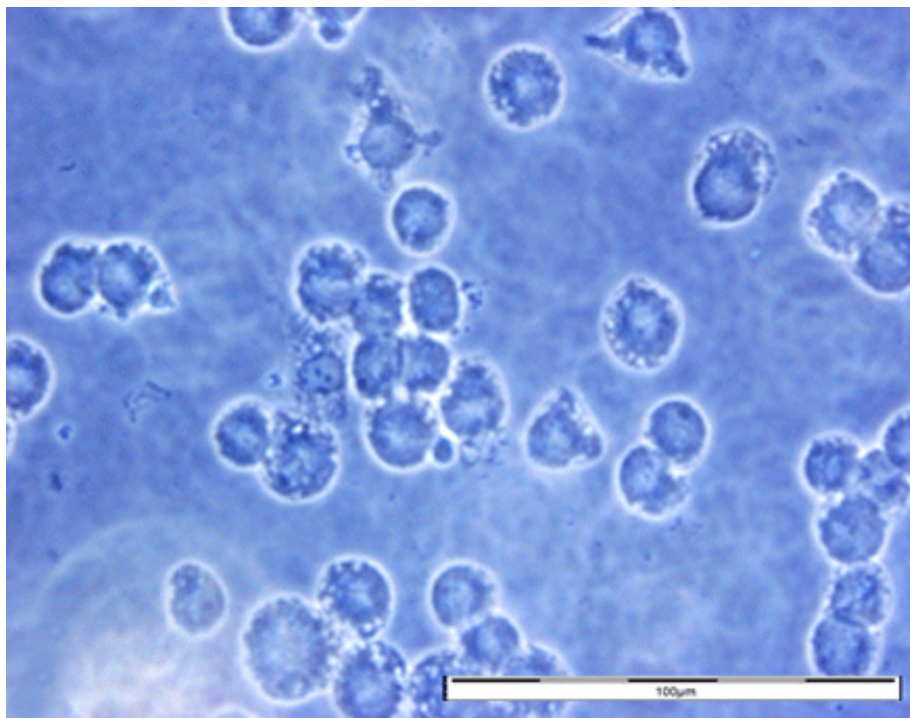


Abb. 2 Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme der J 774-Zelllinie nach Fixierung mit Methanol und Aceton

3.1.5 NIR-Fluoreszenzfarbstoffe

3.1.5.1 Indocyanningrün

Der Fluoreszenzfarbstoff Indocyaningrün (Abb. 3) wurde von FEW Chemicals GmbH, Wolfen zur Verfügung gestellt. Der hydrophile, anionische Cyaninfarbstoff hat ein Molekulargewicht von 775 g/mol. Das Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 784 nm, das Emissionsmaximum zwischen 810 nm und 820 nm (Daten von FEW Chemicals GmbH, Wolfen). In den Experimenten dieser Arbeit war Indocyaningrün Referenz- und Vergleichssubstanz (Positivkontrolle).

Die Reinheit wurde mittels HPLC durch FEW Chemicals GmbH, Wolfen kontrolliert und lag bei mindestens 99 %.

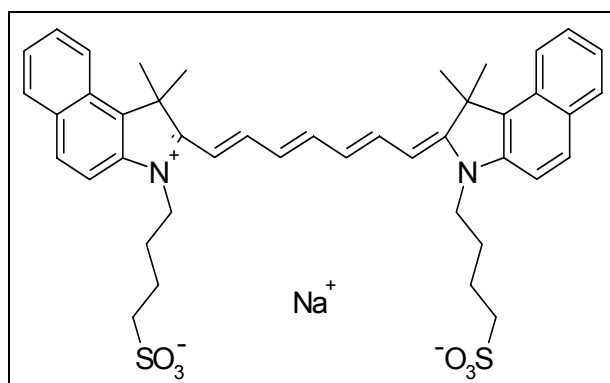


Abb. 3 Strukturformel des NIR-Fluoreszenzfarbstoffes Indocyaningrün (Natriumsalz)

3.1.5.2 DY-Farbstoffe

Im Rahmen dieser Studie wurde mit den Farbstoffen DY-681, DY-731, DY-751 und DY-776 der Firma Dyomics GmbH, Jena gearbeitet (Abb. 4).

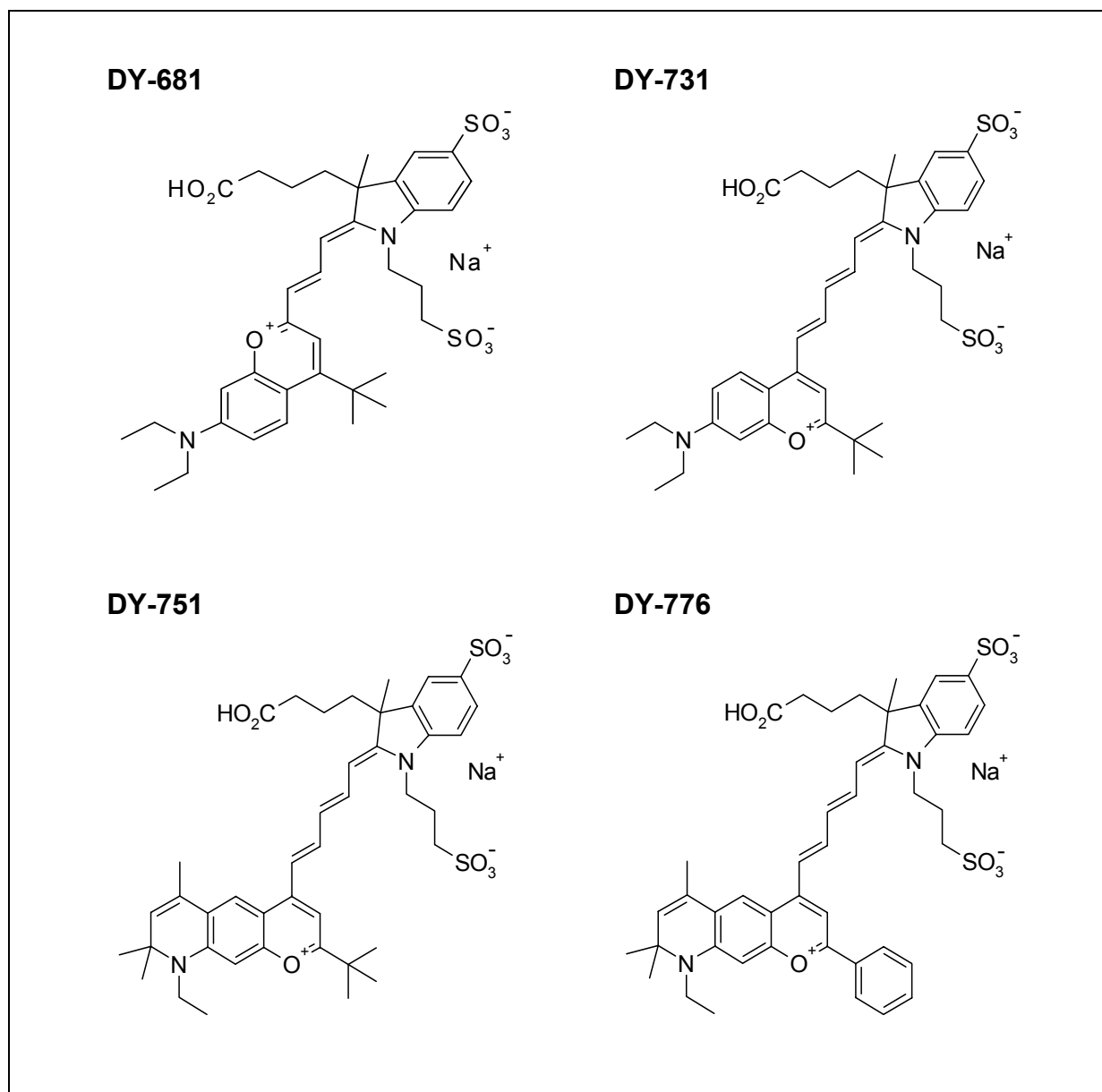


Abb. 4 Strukturformeln der NIR-Fluoreszenzfarbstoffe der DY-Serie (freie Säuren)

Die untersuchten Cyaninfarbstoffe sind Nah-Infrarot-Farbstoffe auf Polymethin-Basis. Der NIR-Bereich des elektromagnetischen Wellenspektrums umfasst Strahlung einer Wellenlänge zwischen 700 nm und 1000 nm. In diesem Spektralbereich liegen die Absorptions- und Emissionsmaxima der Farbstoffe DY-731, DY-751, DY-776 und das Emissionsmaximum des Fluorochroms DY-681. Das Absorptionsmaximum von DY-681 ist im fernen roten Spektrum (650 - 700 nm) zu finden (Tab. 1).

Die Reinheit der Fluoreszenzfarbstoffe lag bei mindestens 90 % (kontrolliert mittels HPLC durch Dyomics GmbH, Jena).

Tab. 1 Molekulargewicht (MG), Absorptionsmaximum (A_{\max}) und Emissionsmaximum (E_{\max}) der NIR-Fluoreszenzfarbstoffe der DY-Serie (freie Säuren) gemessen in Ethanol (Daten von Dyomics GmbH, Jena)

Farbstoff	MG in g/mol	A_{\max} in nm	E_{\max} in nm
DY-681	736,88	691	708
DY-731	762,92	736	759
DY-751	814,99	751	779
DY-776	834,98	771	801

3.1.5.3 S-Farbstoffe

Die NIR-Fluoreszenzfarbstoffe S 0121 und S 0306 (FEW Chemicals GmbH, Wolfen) sind ebenfalls Cyaninfarbstoffe auf Polymethin-Basis (Abb. 5).

S 0121 hat ein Molekulargewicht von 749,36 g/mol. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes liegt bei einer Wellenlänge von 782 nm, das Emissionsmaximum bei 807 nm. S 0306 hat ein Molekulargewicht von 849,48 g/mol. Sein Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 820 nm. Das Emissionsmaximum des Fluorochroms konnte nicht bestimmt werden (Daten von FEW Chemicals GmbH, Wolfen).

Die Reinheit der Farbstoffe war mit mindestens 99 % (S 0121) bzw. mindestens 95 % (S 0306) angegeben (kontrolliert mittels HPLC durch FEW Chemicals GmbH, Wolfen).

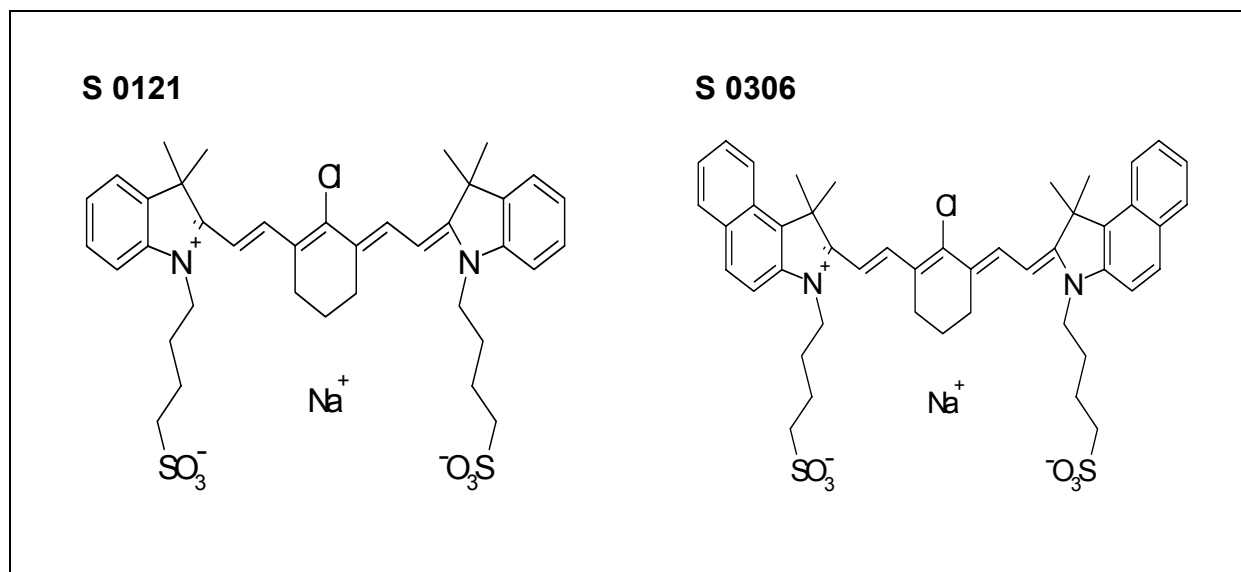


Abb. 5 Strukturformeln der NIR-Fluoreszenzfarbstoffe der S-Serie (Natriumsalze)

3.1.5.4 CY 5.5 monofunctional dye

Das zur Gruppe der Polymethin-Farbstoffe gehörende Cyanin CY 5.5 (Abb. 6) hat ein Molekulargewicht von 1128,41 g/mol. Sein Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 678 nm und das Emissionsmaximum bei 694 nm (Farbstoff und Daten von Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg).

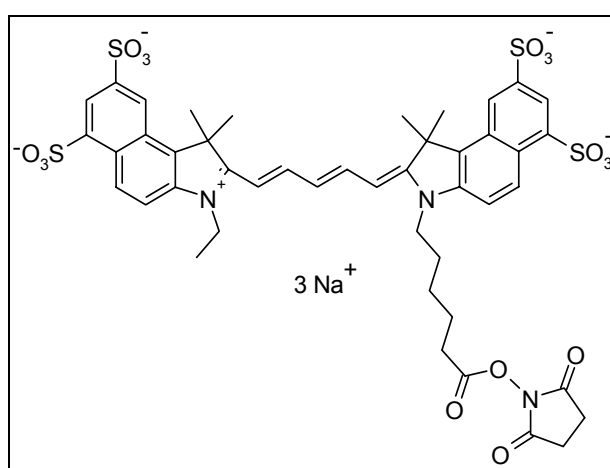


Abb. 6 Strukturformel des NIR-Fluoreszenzfarbstoffes CY 5.5 (NHS-Ester)

3.2 Methoden

3.2.1 Stabilität der NIR-Fluoreszenzfarbstoffe in Lösung

Lösungen: Kulturmedium SVEC 4-10-Zellen (90 % DMEM, 10 % inaktiviertes FKS)
PBS, pH 7,0 - 7,5, Konzentration: 1 M
DMSO (99,5 %)
Stammlösungen, Konzentration: 1 M

In 3 unabhängigen Versuchen wurde das Verhalten der NIR-Fluoreszenzfarbstoffe (ICG, DY-Farbstoffe, S-Farbstoffe und CY 5.5) in biologischen Medien untersucht. Die Lösung der in Pulverform vorliegenden Fluorochrome der DY-Serie und der Farbstoffe CY 5.5 und S 0121 erfolgte in PBS. Indocyaningrün und das Fluorochrom S 0306 mussten in organischem Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst werden, da sie sich in Puffer und destilliertem Wasser nicht lösen ließen. Aus Teilen der konzentrierten Stammlösungen (1 M) wurden dann für jeden Farbstoff verdünnte Versuchsansätze in Phosphat gepufferter Salzlösung und Kulturmedium mit fetalem Kälberserum (10 %) hergestellt (Farbstoffkonzentration in den Ansätzen: 10 µM; Konzentration von DMSO in den Ansätzen von Indocyaningrün und S 0306: 0,1 %). Die Lagerung der in 2 Gruppen aufgeteilten Ansätze erfolgte anschließend bei 4 °C bzw. 37 °C in Dunkelheit.

Die Stabilität der gelösten Fluoreszenzfarbstoffe wurde durch die Messung des Absorptionsmaximums untersucht. Die Bestimmung der Größe erfolgte durch die Aufzeichnung des Absorptionsspektrums bei Wellenlängen zwischen 450 nm und 900 nm erstmals kurz nach Herstellung der Lösungsansätze und dann nach 24, 48, und 72 Stunden. Als Referenz diente Puffer bzw. Kulturmedium ohne Farbstoffzusatz.

Zur Auswertung der Daten wurde die Höhe des Absorptionsmaximums der unmittelbar nach Herstellung der Lösung erfolgten Messung gleich einer relativen Peakhöhe von 100 % gesetzt. Die weiteren Ergebnisse beziehen sich auf diesen Ausgangswert und zeigen die relativen Peakhöhen nach einer Inkubationszeit von 24, 48 und 72 Stunden. Aus den Daten der 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuche wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet. Die statistische

Datenauswertung jedes einzelnen Fluoreszenzfarbstoffes erfolgte durch eine univariate Varianzanalyse mit Messwiederholung unter Benutzung der SPSS 11.5 Software. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

3.2.2 Zellkultur

3.2.2.1 Kultivierung der SVEC 4-10-Zelllinie

Lösungen: PBS, pH 7,0 - 7,5, Konzentration: 1 M

Kulturmedium SVEC 4-10-Zellen (siehe 3.2.1)

Die Kultivierung der Zelllinie erfolgte in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm^2 . Kryokonservierte SVEC 4-10-Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in 15 ml Kulturmedium, welches im Wasserbad temperiert wurde, aufgenommen. Dieser Vorgang erfolgte zügig, um eine Schädigung der Zellen durch das Einfriermedium zu verhindern. Die Kultivierung fand unter Standardbedingungen im Inkubator (5 % CO_2 , 37°C und 95 % Luftfeuchtigkeit) statt. Die Zellen wurden je nach Konfluenz alle 2 - 3 Tage passagiert. Sowohl nach Kultivierung als auch vor und nach Passagierung erfolgte die morphologische Begutachtung der Zellen im Phasenkontrastmikroskop.

3.2.2.2 Subkultivierung der Zelllinien

Lösungen: PBS, pH 7,0 - 7,5, Konzentration: 1 M

Kulturmedium SVEC 4-10-Zellen (siehe 3.2.1)

Kulturmedium J 774-Zellen (90 % DMEM und 10 % FKS)

Trypsin-EDTA-Lösung, Konzentration: 0,25 %

Vor dem Umsetzen wurden die **SVEC 4-10-Zellen** mikroskopisch untersucht und die Zellmorphologie sowie die Zelldichte beurteilt. Waren die Zellen zu 80 - 90 % konfluent, so wurden sie passagiert.

Hierzu erfolgte zuerst eine dreimalige Waschung mit PBS, um somit Spuren von Kulturmedium zu entfernen. Danach wurden 1,5 ml Trypsin/EDTA Lösung auf den Zellrasen (75 cm² Wachstumsfläche) gegeben und für 3 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach erfolgter Ablösung (Beurteilung unter dem Mikroskop) konnten die Zellen in serumhaltigem Kulturmedium aufgenommen werden. Der Serumzusatz bewirkt eine sofortige Inaktivierung des Trypsins und bindet außerdem teilweise das zytotoxische EDTA (Lindl, 2000).

Nach der Zellzahlbestimmung (siehe 3.2.2.3) wurde die Zellsuspension zentrifugiert (5 Minuten, 200 G, 22 °C), der Überstand entfernt und mit frischem Kulturmedium aufgefüllt. Die Zellen wurden dann durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette gut durchmischt und eine Zellzahl, welche an die Wachstumsfläche der Kulturflasche angepasst war, ausgesät. Die Beurteilung der Subkultivierung erfolgte mikroskopisch.

Analog zu der Umsetzung der SVEC 4-10-Zellen wurden die **J 774-Makrophagen** subkultiviert. Die adhärenenten Zellen mussten jedoch vorsichtig mit Hilfe eines Zellschabers und nicht durch Trypsinierung von der Oberfläche der Zellkulturflaschen gelöst werden. Der Anteil vitaler Zellen in den Ansätzen lag nach mikroskopischer Begutachtung bei über 90 %.

3.2.2.3 Zellzahlbestimmung

Lösungen: Trypanblau Stammlösung, 4 mM (400 mg Trypanblau, 100 ml PBS)

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 100 µl der Zellsuspension in 900 µl Trypanblau aufgenommen und gut gemischt. Anschließend wurden 100 µl dieser Suspension vorsichtig auf das Raster einer vorbereiteten Thomakammer pipettiert. Alle Zellen über dem Raster konnten dann unter dem Mikroskop ausgezählt werden. Die Gesamtzellzahl wurde mit Hilfe der folgenden Formel bestimmt:

$$\frac{ZZ \times V_M \times f}{V_T} = \text{Zellzahl/ml}$$

Dabei ist ZZ Zellzahl

 V_M Volumen der Messsuspension

 (900 µl Trypanblau + 100 µl Zellsuspension = 1000 µl)

 f Verdünnungsfaktor

 V_T Volumen der Thomakammer über dem Zählraster (0,064 µl)

Aus dem eben genannten ergab sich folgende Formel:

$$\frac{\text{Zellzahl} \times 1000 \mu\text{l} \times 10}{0,064 \mu\text{l}} = \text{Zellzahl/ml}$$

Gesamtzellzahl = Zellzahl/ml × Gesamtvolumen der Zellsuspension

3.2.2.4 Untersuchung der Zellen auf Mycoplasmenkontamination mittels DAPI-Test

Lösungen: DAPI-Stammlösung (5 µg DAPI, 1 ml Aqua dest.)

Konzentration: 14,3 µM

DAPI-Gebrauchslösung (0,2 ml DAPI-Stammlösung, 10 ml Methanol),

Konzentration: 0,28 µM

PBS, pH 7,0 - 7,5, Konzentration: 1 M

Der DAPI-Test ist ein Verfahren zur Detektion von Mycoplasmen in der Zellkultur (Lindl, 2000). In einer mycoplasmenfreien Kultur werden nur die Zellkerne durch das an die DNA bindende Fluorochrom DAPI (4-6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) angefärbt. Das Zytoplasma zeigt keine Fluoreszenz. Ist außerhalb des Kerns Fluoreszenz zu sehen, so ist eine Kontamination wahrscheinlich, da die mitochondriale DNA bei diesem Verfahren nicht angefärbt wird. Die DNA-Färbung der Mycoplasmen-DNA ist dabei nicht punktförmig, sondern als Schleier um den Kern verteilt zu sehen (Lindl, persönliche Mitteilung).

Der Test wurde bei beiden Zelllinien regelmäßig und vor der Kryokonservierung durchgeführt. In 3 Kammern einer Chamber Slide (Wachstumsfläche 0,8 cm²/Kammer) wurden unterschiedliche Zellzahlen ausgesät (5 bis 10 × 10⁴ Zellen) und das Volumen der Kammern mit Kulturmedium auf jeweils 400 µl aufgefüllt. Es folgte die Inkubation im Brutschrank für 24 Stunden.

Zur DAPI-Färbung wurde zuerst das Kulturmedium abpipettiert und die Zellen dann dreimal mit PBS und einmal mit DAPI-Methanol-Lösung gewaschen. Anschließend wurde in jede Kammer 400 µl DAPI-Methanol-Lösung pipettiert und die Kultur bei 37 °C für 15 Minuten im Brutschrank gefärbt. Die Färbelösung konnte danach abgenommen werden. Die Zellen wurden nun noch einmal mit PBS gewaschen und durch Auflegen eines Deckglases geschützt. Anschließend erfolgte die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 488 nm (100 × Ölimmersionsobjekt).

3.2.2.5 Kryokonservierung von Zellen

Lösungen: Einfriermedium (92 % Kulturmedium, 8 % DMSO)

Die Kryokonservierung dient der Lagerung von Zellen und der Bereitstellung eines Zellpools. Die Zellen sollten zu diesem Zweck vermehrt werden.

Nach Passagierung (siehe 3.2.2.2) und Zählung (siehe 3.2.2.3) wurden die Zellen auf Eis gestellt und das Einfriermedium vorgekühlt. Durch das darin enthaltene Dimethylsulfoxid (DMSO) wird die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zellen verhindert und das Zytoplasma vor Dehydratation geschützt (Lindl, 2000). Die Zellsuspension wurde dann zentrifugiert (5 Minuten, 200 G, 22 °C) und der Überstand entfernt. Anschließend konnte das Kulturmedium durch das Einfriermedium ersetzt werden. Nach sorgfältiger Durchmischung erfolgte die Aufteilung der Suspension auf die vorbereiteten Kryoröhrchen (je 1×10^7 Zellen in 1 ml Einfriermedium). Die Röhrchen wurden anschließend in ein spezielles mit Isopropanol gefülltes Einfriergefäß gestellt und für 2 Tage bei einer Temperatur von -80 °C eingefroren. Danach erfolgte die Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C.

3.2.3 Rahmenbedingungen der Zytotoxizitätsversuche

Neben der Auswahl einer zuverlässigen Testmethode für die Zytotoxizitätsversuche wurde das Wachstum der verwendeten Zelllinien in Voruntersuchungen beobachtet und die gewonnenen Erkenntnisse für die Festlegung zur Aussaat geeigneter Zellzahlen genutzt.

3.2.3.1 Charakterisierung des Methyl-Tetrazolium-Testes (MTT)

Der MTT ist eine Methode zur Messung von Lebensfähigkeit und Wachstum einer Zellpopulation. Mit Hilfe des Testes wird die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen in lebenden Zellen gemessen (Lindl, 2000). Das verwendete Reagenz der Firma Promega (*Cell Titer 96 AQueous One Solution Reagent*) besteht aus einem

Tetrazoliumsalz (MTS) *3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxy-phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium* und Phenazin–Ethosulfat (PES), das Elektronen bindet. Die Dehydrogenasen lebender Zellen wandeln das schwach gelbe Tetrazoliumsalz durch Reduktion in ein alkohollösliches blaues Formazanprodukt um, welches sein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 492 nm hat. Die Intensität der Blaufärbung kann durch die Messung der Absorptionsrate bei 492 nm im Photometer bestimmt werden. Sie ist direkt proportional der Zahl lebender Zellen (Promega, 1999).

3.2.3.2 Ermittlung geeigneter Aussatzzellzahlen

Lösungen: Kulturmedium SVEC 4-10-Zellen (siehe 3.2.1)

Kulturmedium J 774-Zellen (siehe 3.2.2.2)

PBS, pH 7,0 - 7,5, Konzentration: 1 M

Trypsin/EDTA-Lösung (siehe 3.2.2.2)

Cell Titer 96 AQueous One Solution Reagent (siehe 3.2.3.1)

Das Wachstum der SVEC 4-10-Zellen und der J 774-Makrophagen wurde über einen Zeitraum von 96 Stunden durch die photometrische Bestimmung der Aktivität zellulärer Dehydrogenasen mit Hilfe des MTT (siehe 3.2.3.1) evaluiert. Zu diesem Zweck wurden Zellen beider Zelllinien nach Anzüchtung geerntet und gezählt (siehe 3.2.2.2 und 3.2.2.3). Nach Zentrifugation der jeweiligen Zellsuspension (5 Minuten, 200 G, 22 °C) konnte das alte Kulturmedium abgenommen und durch 10 ml neues ersetzt werden.

Die Herstellung der Zellsuspensionen erfolgte entsprechend der festgelegten Zellzahlen (500 bis 15000 Zellen/100 µl/Well). Mit Hilfe einer Mehrkanalpipette wurde jede Zellzahl nach Resuspension der Ansätze in jeweils 6 Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät (Wachstumsfläche: 0,3 cm²/Well). Nach einer Inkubationszeit von 48, 72 und 96 Stunden unter Standardbedingungen (5 % CO₂, 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit) erfolgte die Begutachtung des Wachstums der Zellpopulationen und der Zellmorphologie mit dem Phasenkontrastmikroskop. Zeigten die Zellen ein unverändertes Aussehen, konnte der Methyl-Tetrazolium-Test (siehe 3.2.3.1) durchgeführt werden. Hierzu wurden je 20 µl des Cell Titers 96 AQueous One Solution in jedes Well der Mikrotiterplatten pipettiert und für 45 Minuten bei 5 % CO₂, einer Temperatur von

37 °C, und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Danach konnte die Absorptionsrate bei einer Wellenlänge von 492 nm für jede Zellzahl sechsmal (1×6) im Plattenphotometer bestimmt werden. Die Messparameter waren in allen Versuchen konstant.

Aus den Daten der 1×6 Wells mit gleicher Zellzahl wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt. Die Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte unter Verwendung der Software Sigma Plot 2001.

3.2.4 Zytotoxizität der NIR-Fluoreszenzfarbstoffe

3.2.4.1 Eigenabsorption der NIR-Fluoreszenzfarbstoffe

Lösungen: Stammlösungen (siehe 3.2.1)

Behandlungsmedien SVEC 4-10-Zellen = Kulturmedium SVEC 4-10-Zellen (siehe 3.2.1) und Fluoreszenzfarbstoff in Konzentrationen von 0,5 μM bis 100 μM

Behandlungsmedien J 774-Zellen = Kulturmedium J 774-Zellen (siehe 3.2.2.2) und Fluoreszenzfarbstoff in Konzentrationen von 0,5 μM bis 100 μM

Aus Teilen der konzentrierten Stammlösungen wurden für jedes Fluorochrom Behandlungsmedien mit einer Farbstoffkonzentration von 0,5 μM bis 100 μM hergestellt und ohne Zellen in jeweils 6 Wells einer Mikrotiterplatte pipettiert. Als Kontrolle wurde das entsprechende Kulturmedium mitgeführt. Nach Inkubationszeiten von 24, 48 und 72 Stunden konnte für jede Farbstoffkonzentration die jeweils sechsfache Messung (1×6) der sogenannten Eigenabsorption ohne Zugabe des Tetrazoliumsalzes bei einer Wellenlänge von 492 nm (= Absorptionsmaximum des im MTT gebildeten Formazanproduktes) im Plattenphotometer durchgeführt werden.

Aus den Daten der 1×6 Wells mit gleicher Farbstoffkonzentration wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt und bei der Ergebnisauswertung der Zytotoxizitätsversuche berücksichtigt (siehe 3.2.4.3).

3.2.4.2 Durchführung der Zytotoxizitätsversuche

Lösungen: Behandlungsmedien SVEC 4-10-Zellen (siehe 3.2.4.1)

Behandlungsmedien J 774-Zellen (siehe 3.2.4.1)

PBS, pH 7,0 - 7,5, Konzentration: 1 M

Trypsin/EDTA-Lösung (siehe 3.2.2.2)

Cell Titer 96 AQueous One Solution Reagent (siehe 3.2.3.1)

DMSO (99,5 %)

Die Zytotoxizität der NIR-Fluoreszenzfarbstoffe (DY-Serie, S-Serie und ICG) wurde an Endothelzellen (SVEC 4-10-Zelllinie) und an Mausmakrophagen (J 774-Zelllinie) untersucht.

Entsprechend ihres individuellen Wachstums (siehe 3.2.3.2 und 4.3) wurden die Zellen wie folgt in die 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät:

SVEC 4-10-Zellen

- 24 Stunden Inkubation: 6000 Zellen/100 µl/Well
- 48 Stunden Inkubation: 3000 Zellen/100 µl/Well
- 72 Stunden Inkubation: 1000 Zellen/100 µl/Well

J 774-Zellen

- 24 Stunden Inkubation: 9000 Zellen/100 µl/Well
- 48 Stunden Inkubation: 4000 Zellen/100 µl/Well
- 72 Stunden Inkubation: 1500 Zellen/100 µl/Well

Nach 24-stündiger Inkubation der Zellansätze unter Standardbedingungen (5 % CO₂, 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit) erfolgte die mikroskopische Beurteilung der Zellen nach Wachstum und Morphologie. Zeigte sich ein unverändertes Aussehen, wurde das alte Kulturmedium vorsichtig abpipettiert und die Behandlungsmedien (pro Konzentration jeweils 100 µl/Well in 6 Wells) zugesetzt. Die Konzentrationen der Farbstoffe in den Behandlungsmedien (0,5 µM, 1 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM und 100 µM) waren in Anlehnung an den von Dermatologen der Universität Regensburg bestimmten EC₅₀-Wert von 20,1 ± 3,9 µM (Abels et al., 2000) für ICG festgelegt worden.

In den Experimenten mit den Vertretern der DY-Serie und S 0121 wurden 2 Kontrollansätze (Kulturmedium, Kulturmedium mit Zellen) mitgeführt, bei Indocyaningrün und S 0306 waren 3 Kontrollansätze nötig (Kulturmedium, Kulturmedium mit Zellen, Kulturmedium mit Zellen und DMSO). Durch die zusätzliche Kontrolle mit DMSO konnte der Einfluss des organischen Dimethylsulfoxid auf die Zellvitalität beurteilt werden. Die Konzentration von DMSO betrug sowohl in den Kontrollansätzen als auch in den Versuchsansätzen maximal 0,1 %.

Nach Inkubation der Zellen mit den Farbstoffen für 24, 48 bzw. 72 Stunden unter Standardbedingungen (5 % CO₂, 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit) konnte der MTT zur Erfassung der Zellvitalität durchgeführt werden (siehe 3.2.3.1 und 3.2.3.2). Die Absorptionsrate wurde in einer Versuchsreihe pro Farbstoff und Konzentration sechsmal (1 × 6) gemessen. Da jeder Versuch einmal wiederholt wurde, ist jede Farbstoffkonzentration insgesamt zwölfmal (2 × 6) getestet worden.

Die Beschaffung der für die Zytotoxizitätsversuche benötigten Mengen an CY 5.5 war in der Forschungsphase der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Deshalb wurden hier lediglich Untersuchungen zur Stabilität des Fluoreszenzfarbstoffes in Lösung durchgeführt.

3.2.4.3 Datenauswertung und Statistik

Aus den für jede Konzentration sechsfach gemessenen Absorptionsraten (1×6) einer Versuchsreihe wurden der Mittelwert und die Standardabweichung (Sachs, 1992) gebildet und zur Datenauswertung genutzt. Mit den mitgeführten Kontrollen wurde ebenso verfahren.

Der *bereinigte* Mittelwert der Absorption des Versuchsansatzes X_A aus 6 Parallelen ergab sich aus:

$$X_A = X_V - X_K \pm SD$$

$$SD = \sqrt{SD_V^2 + SD_K^2}$$

Dabei ist:

- X_A bereinigter Mittelwert des Versuchsansatzes (nach Abzug der Absorption von Kulturmedium oder Behandlungsmedium)
- X_K Mittelwert des Kontrollansatzes (Kulturmedium oder Behandlungsmedium ohne Zellen)
- X_V Mittelwert des Versuchsansatzes (Zellen mit Behandlungsmedium oder Zellen mit Kulturmedium ohne Farbstoff)
- SD ermittelte Standardabweichung
- SD_V Standardabweichung des Versuchsansatzes
- SD_K Standardabweichung des Kontrollansatzes

Zum besseren Verständnis der Wirkung der NIR-Fluoreszenzfarbstoffe auf die Zellen wurde anhand der errechneten *bereinigten* Absorptionen die Zellvitalität im Versuchsansatz (ZV_A) mit Hilfe der folgenden Formel bestimmt und im Ergebnisteil unter Verwendung der Software Sigma Plot 2001 graphisch dargestellt:

$$ZV_A \text{ in } \% = \frac{X_A}{X_{UK}} \times 100 \pm SD$$

$$SD \text{ in } \% = \frac{1}{X_{UK}^2} \times \sqrt{X_A^2 \times SD_{UK}^2 + X_{UK}^2 \times SD_A^2} \times 100$$

- Dabei ist:
- ZV_A Zellvitalität im Versuchsansatz [%]
 - X_A bereinigter Mittelwert des Versuchsansatzes (nach Abzug von Kulturmedium oder Behandlungsmedium)
 - X_{UK} bereinigter Mittelwert der unbehandelten Kontrolle (nach Abzug von Kulturmedium)
 - SD ermittelte Standardabweichung [%]
 - SD_A Standardabweichung des Versuchsansatzes
 - SD_{UK} Standardabweichung des Kontrollansatzes

Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde durch eine univariate Varianzanalyse unter Verwendung der Software SPSS 11.5 ermittelt. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Stabilität der NIR-Fluoreszenzfarbstoffe in Lösung

Die Experimente hatten das Ziel, das Verhalten neuer Nah-Infrarot-Fluoreszenzfarbstoffe der DY-Serie, S-Serie und CY-Serie in biologischen Medien zu untersuchen und mit der unter gleichen Rahmenbedingungen getesteten Referenzsubstanz Indocyaningrün zu vergleichen. In Hinblick auf eine potentielle klinische Anwendung der neuen Fluorochrome war es von besonderem Interesse, ob die Substanzen unter *in vivo* nahen Bedingungen in Lösung stabil sind.

Die untersuchten Farbstoffe zeigten in der auf Absorptionsmessung (400 – 900 nm) basierenden Versuchsreihe eine unterschiedliche Stabilität in wässriger Lösung. In welcher Weise sich die Absorptionen der Farbstoffe unter den festgelegten Versuchsbedingungen mit fortschreitender Zeit veränderten, macht das Beispiel ICG bei 4 °C im Lösungsmittel Puffer deutlich (Abb. 7).

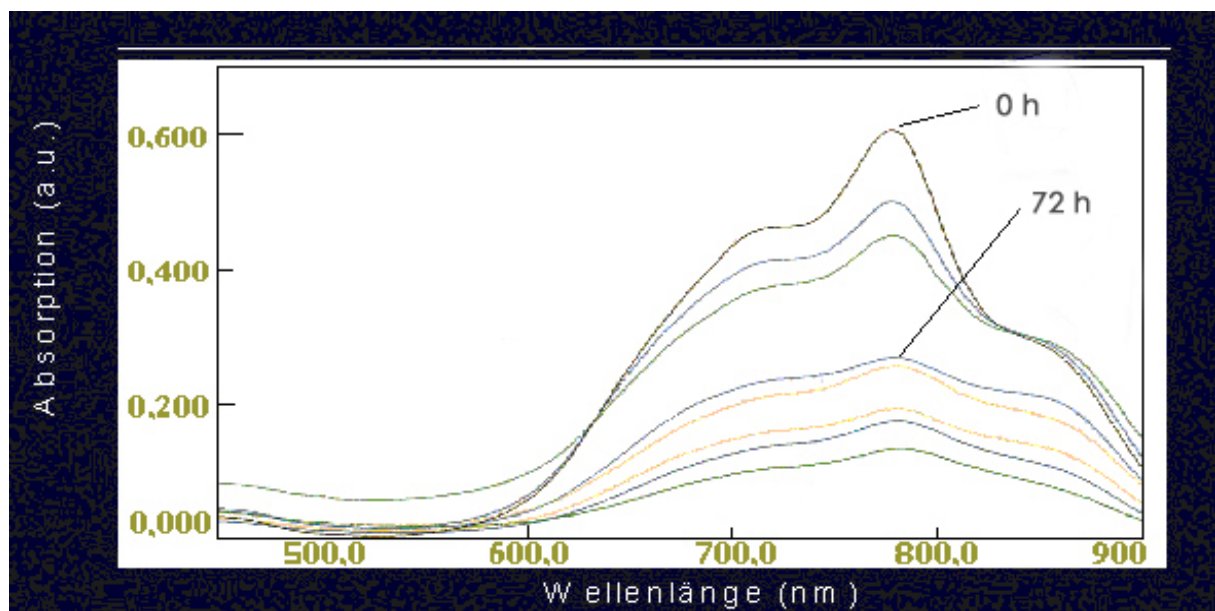


Abb. 7 Abhängigkeit der Absorption des **Indocyaningrüns** von der Zeit Das Absorptionsspektrum des Farbstoffes wurde zwischen einer Wellenlänge von 450 nm und 900 nm in Phosphat gepufferter Salzlösung (10 μ M) gemessen und die Höhe des Absorptionsmaximums bestimmt. Die Abbildung zeigt den Verlauf des Spektrums zum Zeitpunkt der Herstellung der Lösung (0 h) und nach 24, 48, 72, 168, 192, 240 und 264 Stunden (von oben nach unten).

Die zeitabhängige Stabilität der Fluoreszenzfarbstoffe in 10 µM Lösungen ist in den Tabellen 2 – 9 in Form von relativen Peakhöhen der Absorptionsmaxima dargestellt. Eine relative Peakhöhe von 100 % entspricht der Absorption kurz nach Herstellung der Versuchsansätze (0 h). Zu diesem Zeitpunkt hat noch kein Abbau des jeweiligen Farbstoffes stattgefunden. Werte unter 100 % nach 24, 48 und 72 Stunden zeigen einen durch zeitabhängige Konzentrationsveränderungen bedingten Abfall der Höhe des Absorptionsmaximums in Bezug zu der gemessenen Ausgangspeakhöhe und damit einen Verfall des jeweiligen Farbstoffes an.

4.1.1 Stabilität von Indocyaningrün

In den Untersuchungen des Fluoreszenzfarbstoffes **Indocyaningrün** (Tab. 2) waren die zeitlichen Veränderungen der Absorption in den getesteten Lösungsmitteln unterschiedlich ($p < 0,001$).

Tab. 2 Zeitabhängige Stabilität des NIR-Fluoreszenzfarbstoffes **ICG** in wässriger Lösung. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. (* Unterschied zwischen Ergebnis und Ausgangswert statistisch signifikant)

ICG	relative Peakhöhen in %			
	Puffer (PBS)		Kulturmedium	
Zeit (h)	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C
0	100	100	100	100
24	75 ± 7	79 ± 7	99 ± 2	95 ± 5
48	65 ± 9	53 ± 4	92 ± 5	94 ± 4
72	50 ± 7 *	33 ± 10 *	86 ± 8	92 ± 4

Im Lösungsmittel Puffer hatte die Inkubationszeit einen deutlichen Einfluss auf die Höhe des Absorptionsmaximums ($p = 0,010$). Die Ausgangspeakhöhe von 100 % zum Zeitpunkt 0 fiel innerhalb von 72 Stunden signifikant um 50 ± 7 % bei 4 °C ($p = 0,042$) bzw. um 67 ± 10 % bei 37 °C ($p = 0,047$) ab. Der beobachtete Rückgang der relativen

Peakhöhe war bei 37 °C um den Faktor 1,3 höher als bei 4 °C. Signifikanz erreichte der temperaturabhängige Unterschied jedoch nicht ($p = 0,428$).

In Kulturmedium kam es im Vergleich zum Ausgangswert von 100 % zu keinem deutlichen Rückgang des Absorptionsmaximums mit fortschreitender Zeit ($p = 0,541$ bzw. $p = 0,380$). Die Temperatur hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Farbstoffstabilität ($p = 0,403$).

Neben diesen Beobachtungen konnten bei Indocyaningrün deutliche Unterschiede in der Lage des Absorptionsmaximums in Abhängigkeit vom Lösungsmittel festgestellt werden. Der Absorptionspeak des Farbstoffes war in Kulturmedium im Vergleich zu Puffer um ungefähr 20 nm in den Bereich höherer Wellenlängen verschoben.

Insgesamt war Indocyaningrün in Kulturmedium bei einer Temperatur von 37 °C am stabilsten.

4.1.2 Stabilität der DY-Farbstoffe

Die getesteten NIR-Fluoreszenzfarbstoffe der **DY-Serie** waren insgesamt alle stabiler als Indocyaningrün (Tab. 3 - 6).

Das Fluorochrom **DY-681** zeigte sich sowohl in Puffer als auch in Kulturmedium über den gemessenen Zeitraum bei 4 °C bzw. 37 °C sehr stabil (Tab. 3).

Tab. 3 Zeitabhängige Stabilität des NIR-Fluoreszenzfarbstoffes **DY-681** in wässriger Lösung. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

DY-681	relative Peakhöhen in %			
	Puffer (PBS)		Kulturmedium	
Zeit (h)	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C
0	100	100	100	100
24	94 ± 7	98 ± 1	102 ± 6	100 ± 1
48	95 ± 3	100 ± 1	105 ± 13	99 ± 1
72	95 ± 3	100 ± 0	97 ± 1	99 ± 1

In beiden Lösungsmitteln hatte weder die Inkubationszeit ($p = 0,361$ bzw. $p = 0,06$) noch die Temperatur ($p = 0,229$ und $p = 0,085$) einen Einfluss auf die Farbstoffstabilität.

Das Fluorochrom **DY-731** zeigte in Puffer in beiden getesteten Temperaturbereichen und in Kulturmedium bei 37 °C im Vergleich zum Ausgangswert keine deutlichen Veränderungen des Absorptionsmaximums innerhalb von 72 Stunden (Tab. 4).

Tab. 4 Zeitabhängige Stabilität des NIR-Fluoreszenzfarbstoffes **DY-731** in wässriger Lösung. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

DY-731	relative Peakhöhen in %			
	Puffer (PBS)		Kulturmedium	
Zeit (h)	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C
0	100	100	100	100
24	94 ± 0	98 ± 1	87 ± 5	95 ± 2
48	90 ± 2	97 ± 2	84 ± 2	92 ± 2
72	91 ± 2	96 ± 2	81 ± 4	91 ± 3

In Kulturmedium kam es bei 4 °C im 72-stündigen Messzeitraum zum stärksten Rückgang der relativen Peakhöhe des Fluorochroms um 19 ± 4 % auf 81 ± 4 %. Der Unterschied zum Ausgangswert von 100 % erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($p = 0,092$).

In den Untersuchungen des Fluorochroms **DY-751** waren die zeitlichen Änderungen der Absorptionspeakhöhe ebenfalls in Kulturmedium bei einer Temperatur von 4 °C am deutlichsten (Tab. 5). Das Absorptionsmaximum zum Zeitpunkt 0 (100 %) zeigte nach 72 Stunden einen Rückgang um 14 ± 5 % auf 86 ± 5 %. Der Unterschied zum Ausgangswert war jedoch auch hier nicht signifikant ($p = 0,224$).

In Kulturmedium bei 37 °C und in Puffer war der Farbstoff über den festgelegten Messzeitraum stabil.

Tab. 5 Zeitabhängige Stabilität des NIR-Fluoreszenzfarbstoffes **DY-751** in wässriger Lösung. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

DY-751	relative Peakhöhen in %			
	Puffer (PBS)		Kulturmedium	
Zeit (h)	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C
0	100	100	100	100
24	96 ± 1	97 ± 1	92 ± 2	96 ± 1
48	95 ± 1	94 ± 3	92 ± 7	92 ± 1
72	95 ± 1	90 ± 6	86 ± 5	91 ± 1

In den Versuchen mit dem Farbstoff **DY-776** (Tab. 6) konnte kein zeitlicher Einfluss auf die relative Peakhöhe des Absorptionsmaximums über den gemessenen Zeitraum gefunden werden ($p = 0,091$). Eine Abhängigkeit der Farbstoffstabilität vom umgebenden Lösungsmittel bzw. von der Temperatur war ebenfalls nicht nachweisbar ($p = 0,250$ bzw. $p = 0,384$).

Tab. 6 Zeitabhängige Stabilität des NIR-Fluoreszenzfarbstoffes **DY-776** in wässriger Lösung. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

DY-776	relative Peakhöhen in %			
	Puffer (PBS)		Kulturmedium	
Zeit (h)	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C
0	100	100	100	100
24	98 ± 3	97 ± 4	97 ± 1	101 ± 2
48	100 ± 0	97 ± 7	94 ± 2	100 ± 1
72	99 ± 2	97 ± 4	92 ± 3	100 ± 2

4.1.3 Stabilität von CY 5.5

Das Fluorochrom **CY 5.5** war unter den festgelegten experimentellen Bedingungen von allen untersuchten Fluoreszenzfarbstoffen am stabilsten. Die Stabilität des Farbstoffes wurde weder von der Inkubationszeit ($p = 0,196$) noch von der Art des Lösungsmittels ($p = 0,817$) oder der Umgebungstemperatur ($p = 0,124$) beeinflusst (Tab. 7).

Tab. 7 Zeitabhängige Stabilität des NIR-Fluoreszenzfarbstoffes **CY 5.5** in wässriger Lösung. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

CY 5.5	relative Peakhöhen in %			
	Puffer (PBS)		Kulturmedium	
Zeit (h)	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C
0	100	100	100	100
24	102 ± 3	102 ± 4	102 ± 1	100 ± 0
48	102 ± 4	102 ± 3	102 ± 1	100 ± 0
72	102 ± 3	103 ± 4	101 ± 1	102 ± 1

4.1.4 Stabilität der S-Farbstoffe

Der Fluoreszenzfarbstoff **S 0121** (Tab. 8) war in den Lösungsmitteln Puffer und Kulturmedium unterschiedlich stabil ($p < 0,001$).

In Puffer zeigte sich zudem ein Unterschied zwischen den zeitlichen Veränderungen des Absorptionsmaximums bei 4 °C und bei 37 °C ($p = 0,001$). Bei einer Temperatur von 37 °C fiel die relative Peakhöhe im Versuchszeitraum um 27 ± 4 % ab. Der Unterschied zum Ausgangswert von 100 % erreichte fast Signifikanz ($p = 0,051$). Bei 4 °C kam es innerhalb von 72 Stunden zu einem Rückgang des Absorptionspeaks um nur 6 ± 2 %.

In Kulturmedium konnte mit fortschreitender Zeit sowohl bei 4 °C als auch bei 37 °C kein Abfall der relativen Absorptionspeakhöhe beobachtet werden.

Tab. 8 Zeitabhängige Stabilität des NIR-Fluoreszenzfarbstoffes **S 0121** in wässriger Lösung. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

S 0121	relative Peakhöhen in %			
	Puffer (PBS)		Kulturmedium	
Zeit (h)	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C
0	100	100	100	100
24	97 ± 2	90 ± 3	104 ± 2	107 ± 2
48	95 ± 1	82 ± 3	102 ± 3	106 ± 2
72	94 ± 2	73 ± 4	103 ± 3	106 ± 3

Auch bei dem Farbstoff S 0121 zeigten sich deutliche Unterschiede in der Lage des Absorptionsmaximums in Abhängigkeit vom Lösungsmittel. Der Absorptionspeak des Fluorochroms war in Kulturmedium im Vergleich zu Puffer um ungefähr 20 nm in den Bereich höherer Wellenlängen verschoben.

Der Farbstoff war insgesamt stabiler als die Vergleichssubstanz Indocyaningrün.

In den Untersuchungen des Fluoreszenzfarbstoffes **S 0306** wurde ein starker Einfluss des umgebenden Lösungsmittels auf die Farbstoffstabilität deutlich (Tab. 9).

Das Fluorochrom zeigte im Lösungsmittel Puffer bereits 24 Stunden nach Herstellung der Lösung makroskopisch sichtbare Veränderungen. Der Farbstoff war ausgefallen und als Niederschlag am Boden der Messküvette sichtbar. Die relative Peakhöhe konnte nicht mehr eindeutig bestimmt werden.

In Kulturmedium wurde im Gegensatz dazu ein weitestgehend konstantes Absorptionsmaximum des Farbstoffes innerhalb des Messzeitraumes beobachtet. Die Stabilität von S 0306 war in dem proteinreichen Lösungsmittel mit der Stabilität von ICG vergleichbar.

Tab. 9 Zeitabhängige Stabilität des NIR-Fluoreszenzfarbstoffes **S 0306** in wässriger Lösung. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen (* Farbstoff war ausgefallen).

S 0306	relative Peakhöhen in %			
	Puffer (PBS)		Kulturmedium	
Zeit (h)	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C
0	100	100	100	100
24	–*	–*	99 ± 1	98 ± 1
48	–*	–*	97 ± 1	94 ± 1
72	–*	–*	98 ± 1	90 ± 2

4.2 Zellkultur – DAPI-Test

Eine Kontamination der untersuchten Zellpopulationen durch Mycoplasmen konnte anhand des regelmäßig, und vor der Kryokonservierung, durchgeführten DAPI-Testes ausgeschlossen werden. Nach Anfärbung der SVEC 4-10-Zellen (Abb. 8) und der J 774-Makrophagen (Abb. 9) mit dem Fluorochrom DAPI zeigten sich im Fluoreszenzlicht leuchtend blaue Zellkerne. Die Zellen waren scharf zu deren Umgebung abgegrenzt. Das Zytoplasma erschien unauffällig.

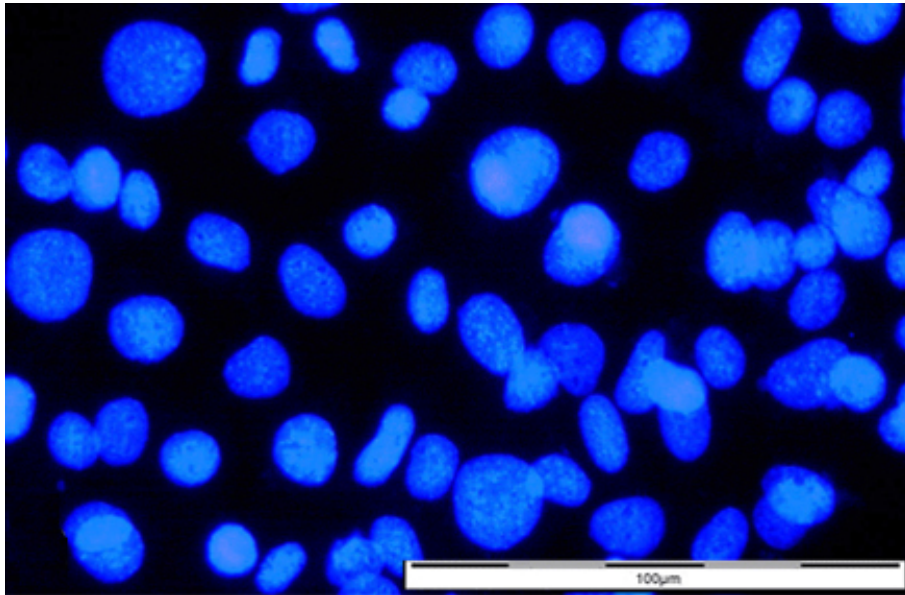


Abb. 8 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der SVEC 4-10-Zelllinie nach Anfärbung mit DAPI-Fluorochrom (spezifisch an DNA-bindendes Fluorochrom). Die Zellkerne sind deutlich angefärbt und scharf zur Umgebung abgegrenzt. Anzeichen einer Kontamination mit Mycoplasmen fehlen.

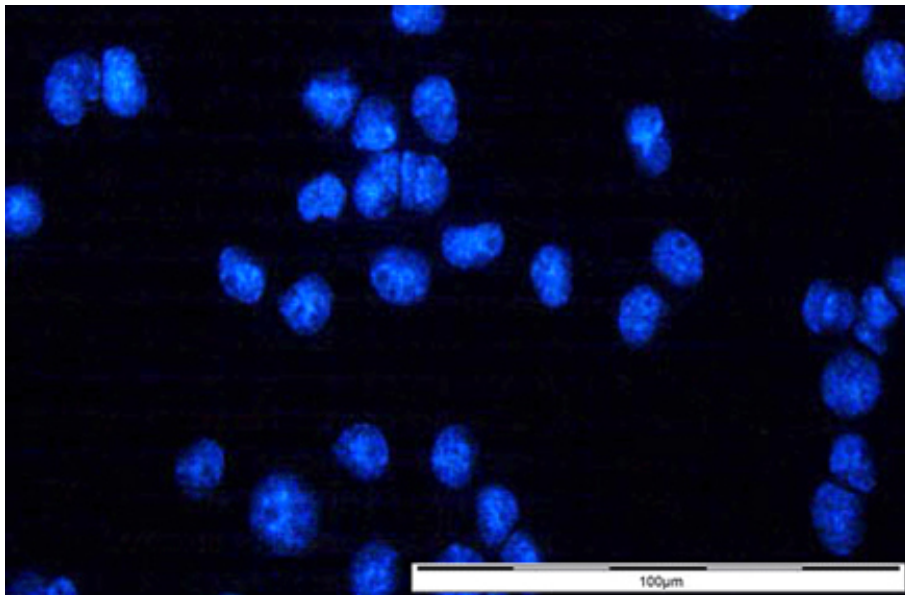


Abb. 9 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der J 774-Zelllinie nach Anfärbung mit DAPI-Fluorochrom (spezifisch an DNA-bindendes Fluorochrom). Die Zellkerne sind deutlich angefärbt und scharf zur Umgebung abgegrenzt. Anzeichen einer Kontamination mit Mycoplasmen fehlen.

4.3 Rahmenbedingungen der Zytotoxizitätsversuche

Ermittlung geeigneter Aussaatzellzahlen

Zur optimalen Durchführung der Zytotoxizitätsversuche auf der Basis konfluenter und noch nicht in die stationäre Wachstumsphase eingetretener Zellkulturen wurden Aussaatzellzahlen für verschiedene Wachstumszeiten ermittelt (siehe 3.2.3.2). Bei beiden Zelllinien zeigte sich, dass die mittels MTT (siehe 3.2.3.1) bestimmte Enzymaktivität zellulärer Dehydrogenasen abhängig von der eingesäten Zellzahl und von der Inkubationszeit war (Abb. 10A/B).

Bei den Endothelzellen (SVEC 4-10-Zelllinie) war nach 48-stündiger Inkubationszeit bis zur höchsten ausgesäten Zellzahl von $1,5 \times 10^4$ Zellen/Well eine kontinuierliche Zunahme der gemessenen Absorptionsrate und damit eine Linearität zwischen der Enzymaktivität und der ausgesäten Zellzahl erkennbar (Abb. 10A). Nach Inkubationszeiten von 72 und 96 Stunden zeigte sich der lineare Bereich nur bis zu einer Aussaatzahl von 9×10^3 Zellen/Well. Bei höheren Aussaatzellzahlen kam es zu einem Rückgang der Absorptionsraten.

Auch bei den J 774-Makrophagen (Abb. 10B) zeigte sich nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden bis zur höchsten Aussaatzellzahl von $1,5 \times 10^4$ Zellen/Well ein linearer Bereich zwischen der bei 492 nm ermittelten Enzymaktivität und der Zellzahl. Nach Inkubationszeiten von 72 und 96 Stunden war eine Linearität zwischen den beiden Größen nur bis zu Aussaatzellzahlen von 9×10^3 bzw. 6×10^3 Zellen/Well gegeben. Im Bereich höherer ausgesäter Zellzahlen konnte ein Abfall der Absorptionsraten beobachtet werden.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden für die Zytotoxizitätsversuche mit den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffen Aussaatzellzahlen von 6000 (24h), 3000 (48h) und 1000 (72h) Endothelzellen pro 100 μ l/Well und 9000 (24h), 4000 (48h) und 1500 (72h) Makrophagen pro 100 μ l/Well festgelegt (siehe 3.2.4.2).

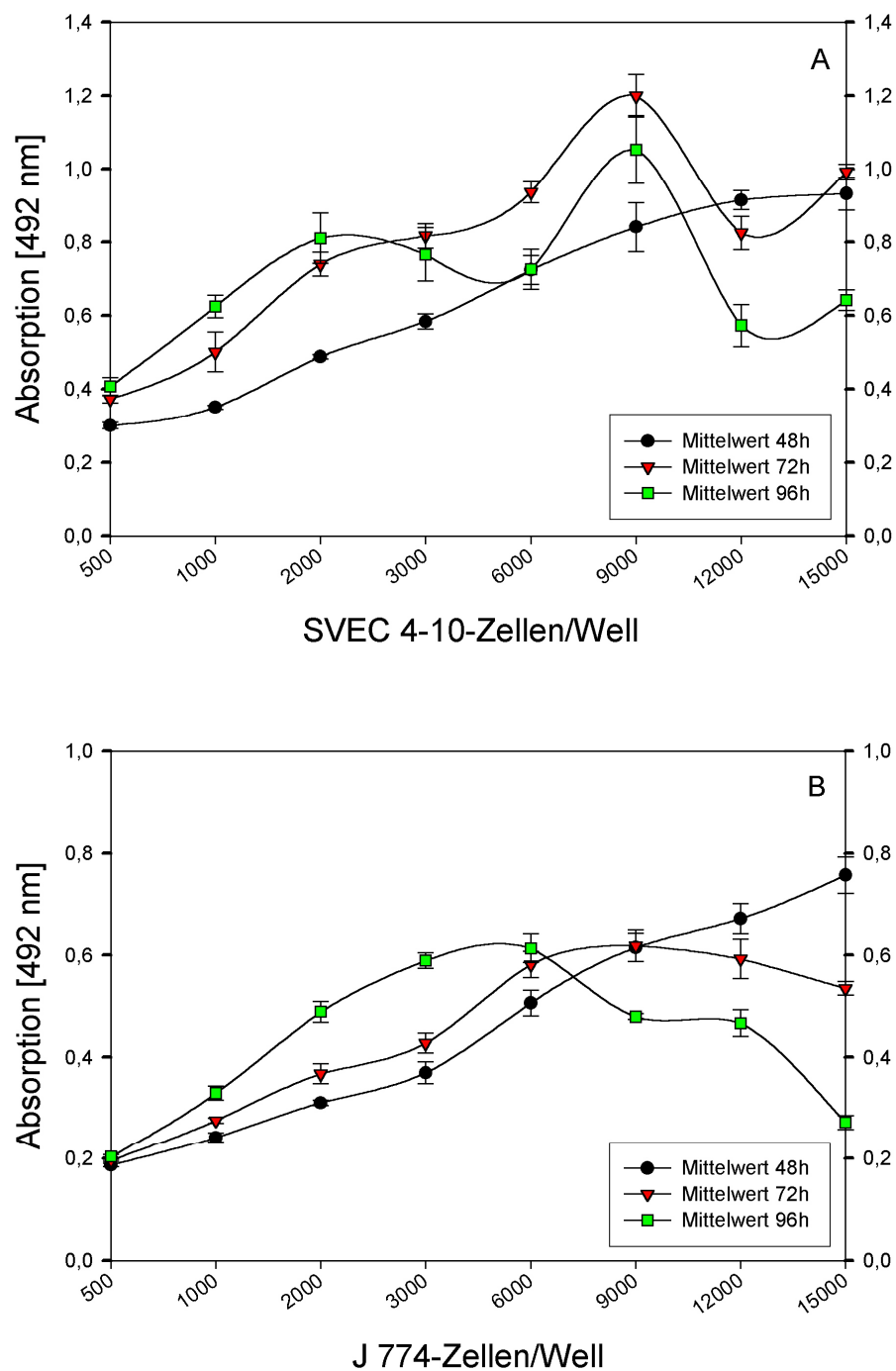


Abb. 10 Darstellung der enzymalen Aktivität der zellulären Dehydrogenasen in Abhängigkeit von der Aussatzzellzahl der SVEC 4-10-Zellen (A) bzw. J 774-Makrophagen (B) und der Zeit. Die ausgesäten Zellen wurden für 48, 72 und 96 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert. Nach entsprechender Kulturdauer wurde die Enzymaktivität der zellulären Dehydrogenasen durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 492 nm ermittelt (MTT). Sie ist proportional der Zahl lebender Zellen in einer Population. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen errechnen sich aus jeweils sechsfach (1×6) mitgeführten Ansätzen.

4.4 Zytotoxizität der NIR-Fluoreszenzfarbstoffe

4.4.1 Eigenabsorption der NIR-Fluoreszenzfarbstoffe

Die untersuchten NIR-Fluorochrome zeigten bei einer Wellenlänge von 492 nm eine unterschiedlich hohe Eigenabsorption. Diese stieg mit zunehmender Farbstoffkonzentration im Lösungsmittel Kulturmedium unabhängig von der Inkubationszeit stetig an. Besonders hohe Absorptionsraten wurden im Bereich der Konzentrationen 50 μM und 100 μM ermittelt. Die höchsten Absorptionswerte zeigte insgesamt der Farbstoff DY-681 (Abb. 11A/B).

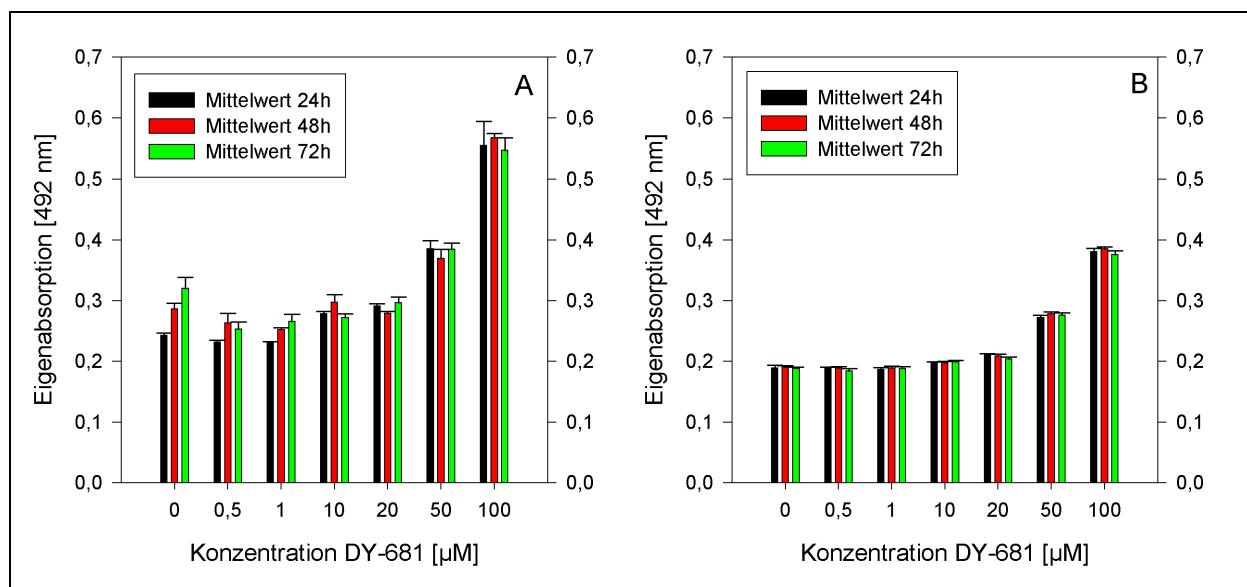


Abb. 11 Konzentrationsabhängige Eigenabsorption von **DY-681** bei einer Wellenlänge von 492 nm in Kulturmedium der SVEC 4-10-Zellen (A) und in Kulturmedium der J 774-Zellen (B) nach Inkubationszeiten von 24, 48 und 72 Stunden. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen errechnen sich aus jeweils sechsfachen Ansätzen (1×6). Die Konzentration 0 μM zeigt die Absorption des mitgeführten Kulturmediums ohne Farbstoff.

Die gemessenen Eigenabsorptionen der anderen untersuchten Fluorochrome waren im Vergleich zu DY-681 in allen Konzentrationsbereichen geringer, wie das Beispiel des Farbstoffes S 0121 exemplarisch verdeutlicht (Abb. 12A/B).

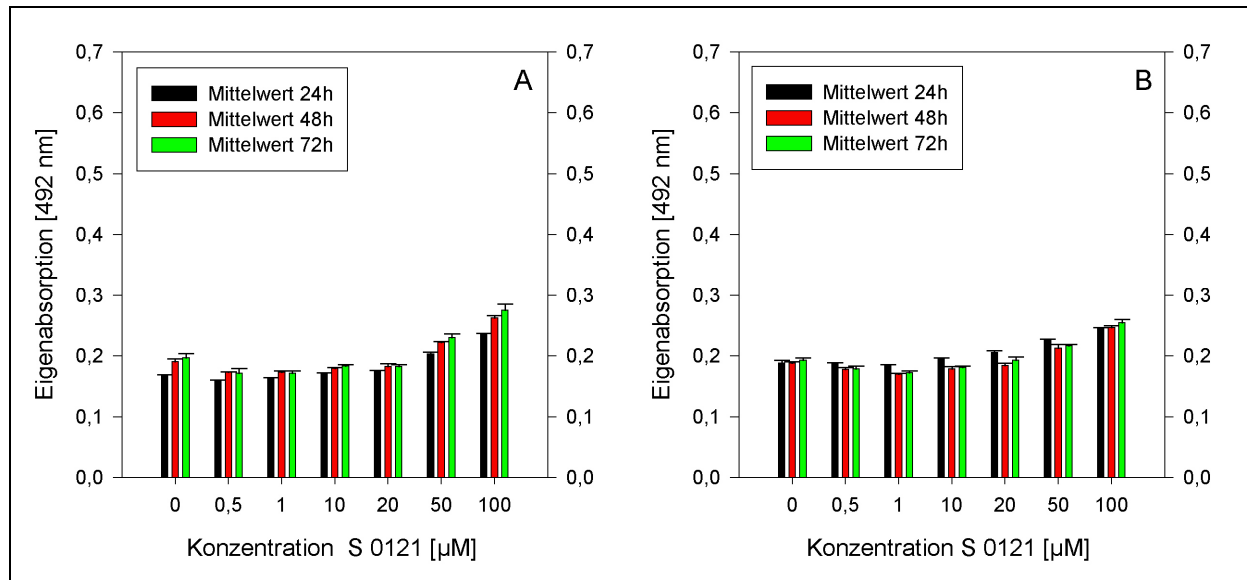


Abb. 12 Konzentrationsabhängige Eigenabsorption von **S 0121** bei einer Wellenlänge von 492 nm in Kulturmedium der SVEC 4-10-Zellen (A) und in Kulturmedium der J 774-Zellen (B) nach Inkubationszeiten von 24, 48 und 72 Stunden. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen errechnen sich aus jeweils sechsfachen Ansätzen (1×6). Die Konzentration 0 µM zeigt die Absorption des mitgeführten Kulturmediums ohne Farbstoff.

4.4.2 Ergebnisse der Zytotoxizitätsversuche

Die *in vitro* Experimente hatten das Ziel, erstmals die Wirkung der Fluoreszenzfarbstoffe der DY-Serie und S-Serie auf ausgewählte Zelllinien zu testen und sie mit der ebenfalls untersuchten Referenzsubstanz Indocyaningrün zu vergleichen. Durch die Festlegung konstanter und klinisch relevanter Versuchsparameter war es möglich, eine Abhängigkeit der Farbstoffwirkung von äußeren Faktoren zu detektieren. Unter Berücksichtigung der gewonnenen Daten konnte die Eignung der Substanzen für einen *in vivo* Einsatz als optische Kontrastmittel gut abgeschätzt werden.

Die Wirkung der untersuchten NIR-Farbstoffe auf die Vitalität der SVEC 4-10-Zellen und der J 774-Zellen war unterschiedlich und ist im Folgenden für jedes Fluorochrom einzeln beschrieben und graphisch dargestellt.

4.4.2.1 Zytotoxizität von Indocyaningrün

Die Untersuchungen des Fluoreszenzfarbstoffes **Indocyaningrün (ICG)** zeigten einen deutlichen Einfluss der Farbstoffkonzentration ($p < 0,001$) auf die Vitalität der Endothelzellen der SVEC 4-10-Zelllinie (Abb. 13A/B). Im Bereich hoher Konzentrationen (50 μM und 100 μM) war der Unterschied zwischen der Zellvitalität der behandelten Ansätze und der unbehandelten Kontrolle signifikant ($p = 0,001$). Der Rückgang des Anteils lebender Zellen in den Versuchsansätzen lag bei 50 μM zwischen $9 \pm 6 \%$ und $28 \pm 15 \%$, bei 100 μM zwischen $22 \pm 8 \%$ und $40 \pm 3 \%$. Die Inkubationszeit hatte keinen nachweisbaren Einfluss auf die Vitalität der Endothelzellen ($p = 0,431$).

Die Zellvitalität der Makrophagen der J 774-Zelllinie (Abb. 13C/D) stand ebenfalls unter dem Einfluss der Farbstoffkonzentration ($p < 0,001$). Signifikante Unterschiede zwischen der Zellvitalität in den mit **Indocyaningrün** behandelten Ansätzen und der mitgeführten unbehandelten Kontrolle wurden schon ab mittleren Farbstoffkonzentrationen (10 μM und 20 μM) erreicht ($p = 0,033$). Der Rückgang der Zahl lebender Zellen betrug maximal $88 \pm 6 \%$. In hohen Konzentrationen (50 μM und 100 μM) konnte der Unterschied zwischen unbehandelter Kontrolle und den behandelten Versuchsansätzen noch deutlicher nachgewiesen werden ($p < 0,001$). Hier lag der Abfall der Zellvitalität bei maximal $93 \pm 4 \%$. Im Gegensatz zu den SVEC 4-10-Zellen wurden bei den J 774-Makrophagen in mittleren und hohen Konzentrationen zudem Tendenzen einer Zeitabhängigkeit der Vitalität beobachtet. Beispielsweise fiel die Zahl lebender Makrophagen in den Ansätzen im Bereich von 50 μM und 100 μM ICG innerhalb von 24 Stunden um maximal $56 \pm 7 \%$ ab. Nach 48 und 72 Stunden war im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ein Rückgang um maximal $86 \pm 4 \%$ bzw. $93 \pm 4 \%$ festzustellen.

Der unter dem Einfluss von Indocyaningrün beobachtete Rückgang der Zellvitalität war bei den Makrophagen insgesamt ausgeprägter als bei den Endothelzellen.

Das organische Lösungsmittel DMSO hatte in dem mitgeführten Kontrollansatz in der Konzentration von maximal 0,1 % nachweislich keinen zytotoxischen Einfluss auf die Zellen beider Zelllinien.

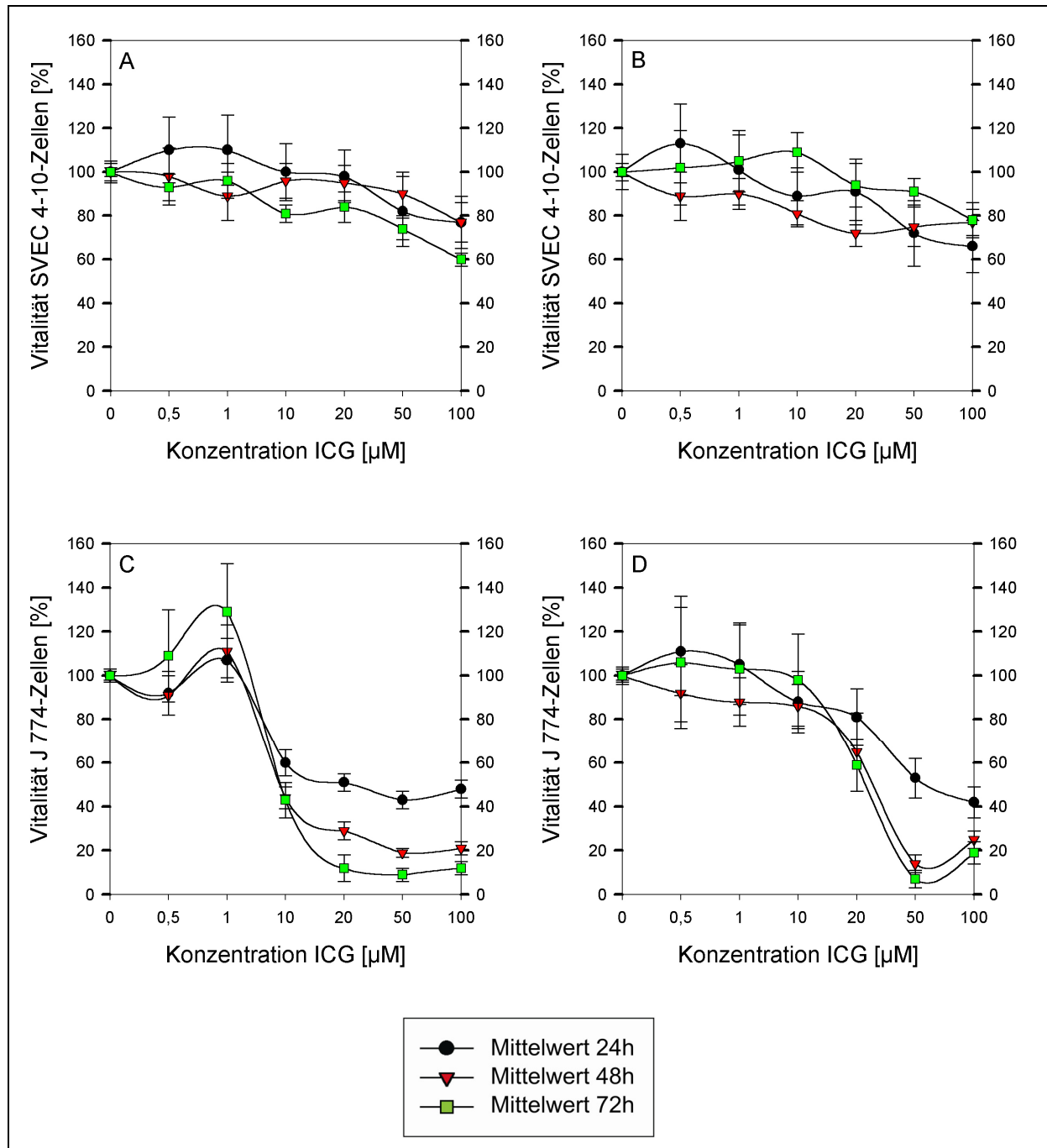


Abb. 13 Vitalität der SVEC 4-10-Zellen (A/B) und der J 774-Makrophagen (C/D) 24, 48 und 72 Stunden nach Behandlung der Zellpopulationen mit **Indocyaningrün** in definierten Konzentrationen von 0,5 μM bis 100 μM. Die ausgewerteten Ergebnisse der zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuche sind nebeneinander dargestellt. Mittelwert und Standardabweichung einer Versuchsreihe wurden aus jeweils sechsfachen Ansätzen (1 × 6) bestimmt. Die Zellvitalität der unbehandelten Kontrolle (0 μM) wurde stets 100 % gesetzt und zur besseren Veranschaulichung mit aufgeführt.

4.4.2.2 Zytotoxizität der DY-Farbstoffe

Nach Behandlung der Zellen mit den **DY-Farbstoffen** kam es sowohl bei den Endothelzellen als auch bei den Makrophagen innerhalb des Inkubationszeitraumes von 72 Stunden zu keinem deutlichen Abfall der Zahl lebender Zellen in den untersuchten Populationen. Im Vergleich zu der Referenzsubstanz Indocyaningrün waren die Farbstoffe der DY-Serie demnach weitaus weniger zytotoxisch. Teilweise konnten in den Experimenten jedoch sehr hohe Standardabweichungen festgestellt werden. Außerdem fiel auf, dass die errechnete Vitalität häufig Werte von über 100 % erreichte.

Die erste Versuchsreihe des Fluoreszenzfarbstoffes **DY-681** ließ einen tendenziellen Rückgang der Vitalität der SVEC 4-10-Zellen mit steigender Farbstoffkonzentration und fortschreitender Inkubationszeit erkennen (Abb. 14A). Die Zahl lebender Endothelzellen war beispielsweise bei einer Konzentration von 100 μM nach 24-stündiger Inkubation um $44 \pm 17 \%$, nach 72 Stunden um $48 \pm 10 \%$ abgefallen. Dieser Effekt wurde im Wiederholungsversuch allerdings nicht bestätigt (Abb. 14B). Statistisch konnte ebenfalls kein Einfluss der Farbstoffkonzentration ($p = 0,319$) und der Inkubationszeit ($p = 0,565$) auf die Vitalität der SVEC 4-10-Zellen nachgewiesen werden.

Bei den J 774-Makrophagen (Abb. 14C/D) kam es mit steigender Konzentration von **DY-681** und fortschreitender Inkubationszeit zu keinem deutlichen Abfall der Zahl vitaler Zellen in den Versuchsansätzen (max. $26 \pm 7 \%$ bei 100 μM nach 24 Stunden).

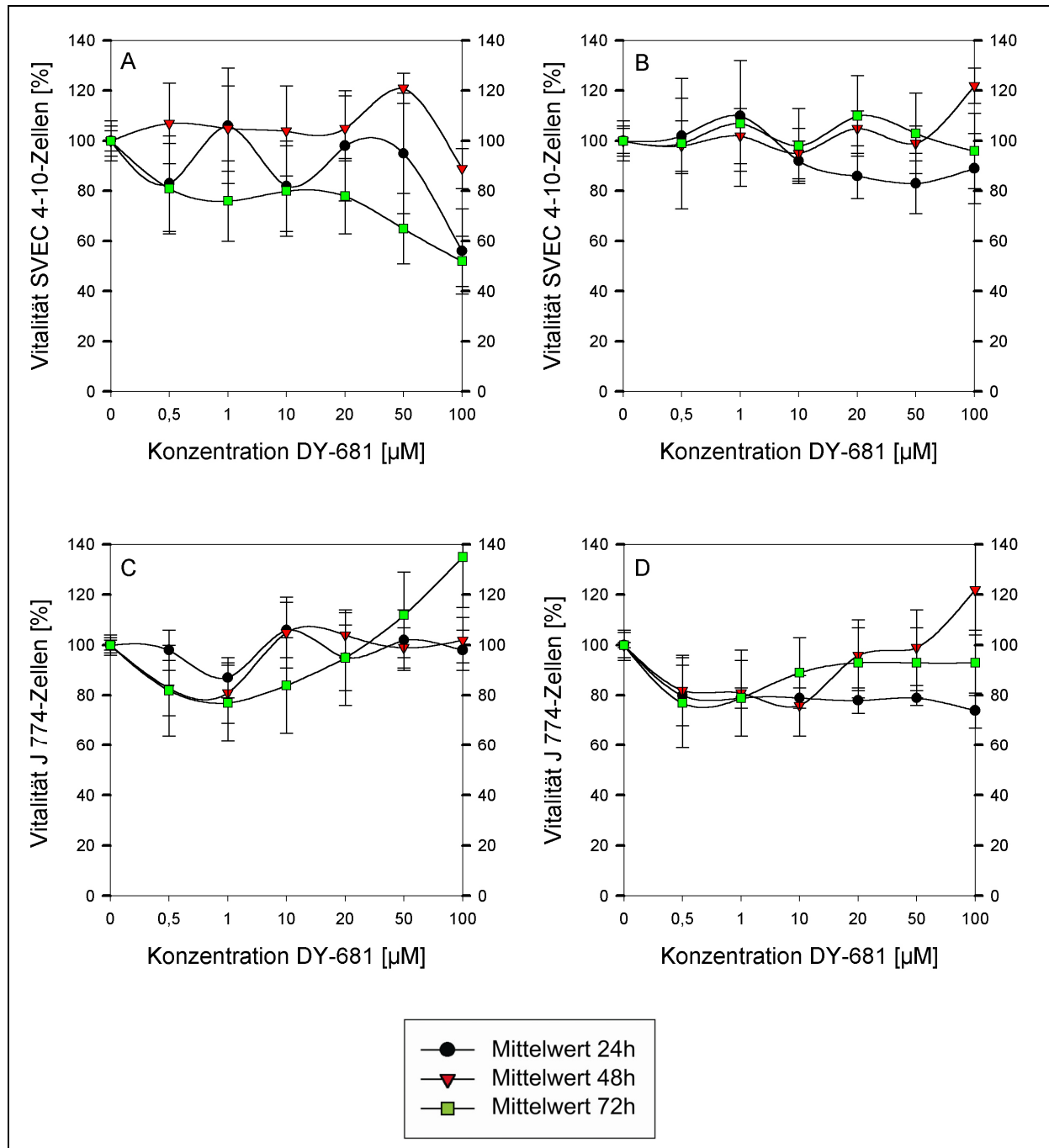


Abb. 14 Vitalität der SVEC 4-10-Zellen (A/B) und der J 774-Makrophagen (C/D) 24, 48 und 72 Stunden nach Behandlung der Zellpopulationen mit **DY-681** in definierten Konzentrationen von 0,5 µM bis 100 µM. Die ausgewerteten Ergebnisse der zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuche sind nebeneinander dargestellt. Mittelwert und Standardabweichung einer Versuchsreihe wurden aus jeweils sechsfachen Ansätzen (1 × 6) bestimmt. Die Zellvitalität der unbehandelten Kontrolle (0 µM) wurde stets 100 % gesetzt und zur besseren Veranschaulichung mit aufgeführt.

Nach Behandlung der Endothelzellen mit dem Farbstoff **DY-731** zeigte sich im Wiederholungsversuch bei einer Konzentration von 0,5 μM DY-731 schon nach 24-stündiger Inkubationsdauer ein deutlicher Abfall des Anteils lebender SVEC 4-10-Zellen in der Population um $74 \pm 14 \%$ (Abb. 15B). Dieser verstärkte sich tendenziell noch mit zunehmender Inkubationszeit. Eine Abnahme des Anteils lebender Endothelzellen im Ansatz zeigte sich im Wiederholungsversuch teilweise auch bei einer Farbstoffkonzentration von 1 μM . Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden konnte hier in der Population im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ein Rückgang der Vitalität um $54 \pm 26 \%$ ermittelt werden. Dagegen war bei höheren Konzentrationen (10 - 100 μM) und in der ersten Versuchsreihe (Abb. 15A) kein deutlicher zytotoxischer Effekt des Fluorochroms zu beobachten. Die Vitalität der Endothelzellen stand insgesamt weder unter dem Einfluss der Farbstoffkonzentration ($p = 0,120$) noch der Inkubationszeit ($p = 0,359$). Die Standardabweichungen waren in den Versuchen zum Teil auffallend hoch. Die Werte schwankten zwischen 1 % und 48 %. Weiterhin wurde häufig ein Anstieg der Zellvitalität auf deutlich über 100 % (maximal 158 %) beobachtet.

Auf die Vitalität der Makrophagen (Abb. 15C/D) hatten die getesteten Konzentrationen von 0,5 μM bis 100 μM **DY-731** und die fortschreitende Inkubationszeit keinen nachweisbaren Effekt ($p = 0,172$ bzw. $p = 0,380$). Der im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtete maximale Rückgang der Zellvitalität um $33 \pm 8 \%$ (bei 0,5 μM nach 72 Stunden) wurde im Wiederholungsversuch und auch in höheren getesteten Konzentrationen nicht bestätigt.

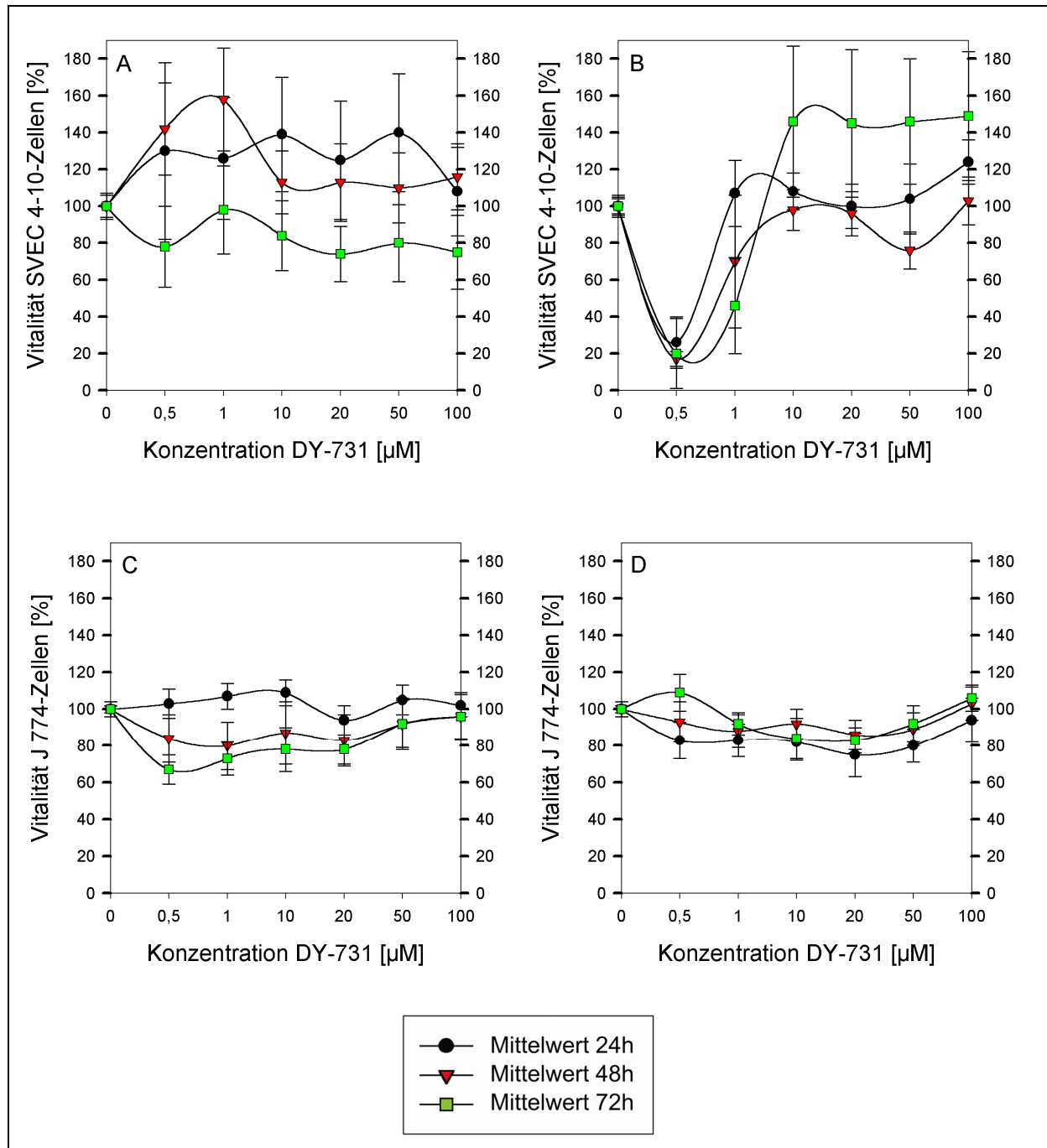


Abb. 15 Vitalität der SVEC 4-10-Zellen (A/B) und der J 774-Makrophagen (C/D) 24, 48 und 72 Stunden nach Behandlung der Zellpopulationen mit **DY-731** in definierten Konzentrationen von 0,5 μM bis 100 μM. Die ausgewerteten Ergebnisse der zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuche sind nebeneinander dargestellt. Mittelwert und Standardabweichung einer Versuchsreihe wurden aus jeweils sechsfachen Ansätzen (1 × 6) bestimmt. Die Zellvitalität der unbehandelten Kontrolle (0 μM) wurde stets 100 % gesetzt und zur besseren Veranschaulichung mit aufgeführt.

In den Experimenten mit dem Fluorochrom **DY-751** (Abb. 16A/B und C/D) hatten die Faktoren Inkubationszeit und Farbstoffkonzentration weder einen deutlichen Einfluss auf die Vitalität der untersuchten SVEC 4-10-Zellen ($p = 0,492$ bzw. $p = 0,321$) noch auf die J 774-Makrophagen ($p = 0,712$ bzw. $p = 0,533$). Leichte Rückgänge des Anteils lebender Endothelzellen im Ansatz konnten allerdings bei Farbstoffkonzentrationen von $1\ \mu\text{M}$, $20\ \mu\text{M}$ und $100\ \mu\text{M}$ nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden detektiert werden. Die Zellvitalitäten fielen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um $21 \pm 18\ %$ bzw. $17 \pm 6\ %$ ($1\ \mu\text{M}$), $11 \pm 13\ %$ bzw. $18 \pm 6\ %$ ($20\ \mu\text{M}$) und $21 \pm 15\ %$ bzw. $12 \pm 10\ %$ ($100\ \mu\text{M}$) ab (Abb. 16A/B).

Insgesamt konnte auch bei dem Farbstoff DY-751 ein häufiger Anstieg der Zellvitalität auf über $100\ %$ beobachtet werden. Die Standardabweichungen der Ergebnisse waren bei beiden untersuchten Zelllinien oft hoch. Es wurden Werte zwischen $3\ %$ und maximal $29\ %$ errechnet.

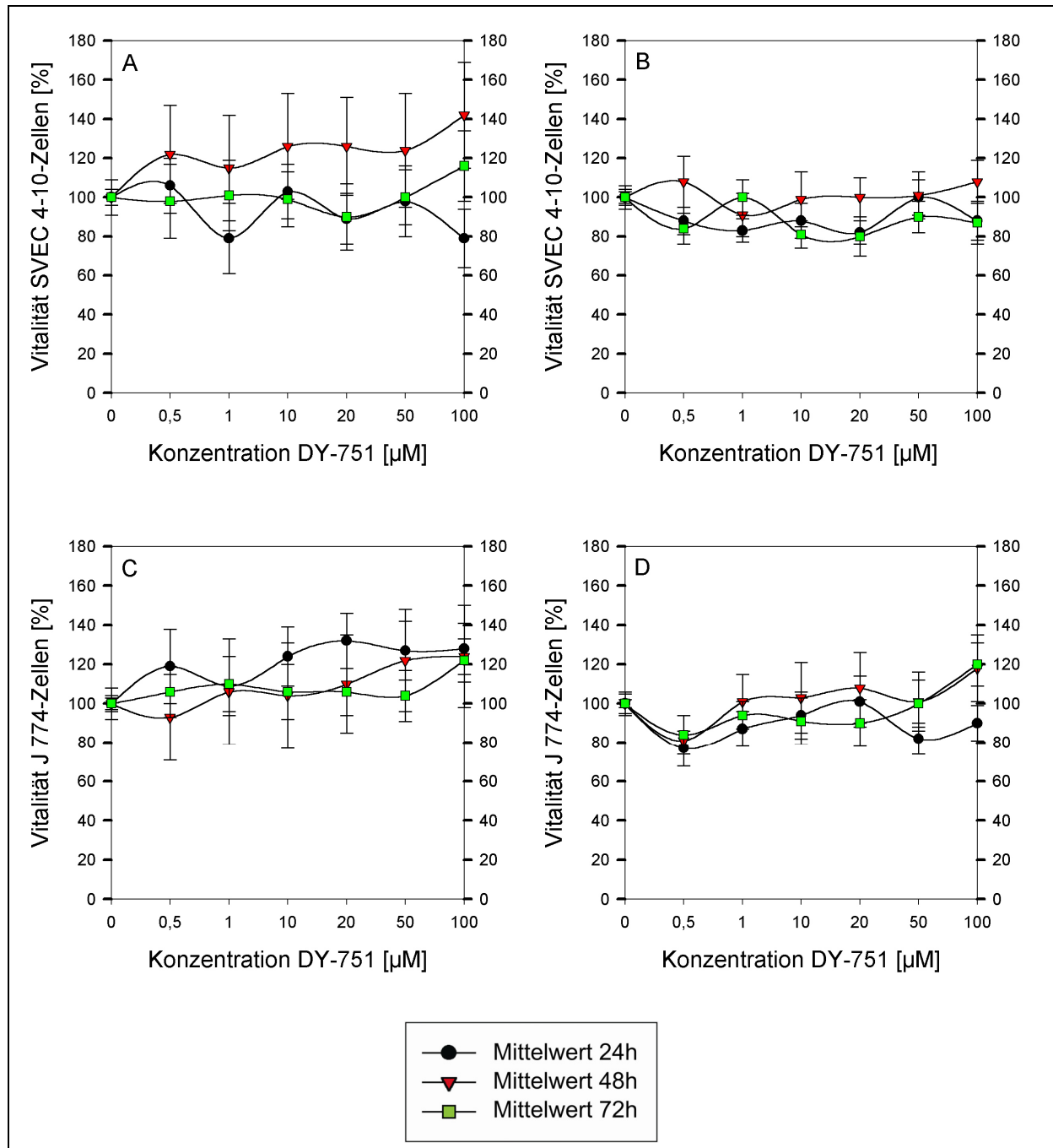


Abb. 16 Vitalität der SVEC 4-10-Zellen (A/B) und der J 774-Makrophagen (C/D) 24, 48 und 72 Stunden nach Behandlung der Zellpopulationen mit **DY-751** in definierten Konzentrationen von 0,5 µM bis 100 µM. Die ausgewerteten Ergebnisse der zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuche sind nebeneinander dargestellt. Mittelwert und Standardabweichung einer Versuchsreihe wurden aus jeweils sechsfachen Ansätzen (1×6) bestimmt. Die Zellvitalität der unbehandelten Kontrolle (0 µM) wurde stets 100 % gesetzt und zur besseren Veranschaulichung mit aufgeführt.

Die Behandlung der Endothelzellen und der Makrophagen mit **DY-776** führte zu keinem deutlichen Abfall des Anteils lebender Zellen in den jeweiligen Versuchsansätzen (Abb. 17A/B und 17C/D). Es konnte keine Abhängigkeit der Zellvitalität von der Inkubationsdauer ($p = 0,355$ bzw. $p = 0,106$) oder der Farbstoffkonzentration ($p = 0,895$ bzw. $p = 0,762$) festgestellt werden. Abweichend davon wurde in beiden Wiederholungsversuchen (Abb. 17B/D) nach 24-stündiger Inkubation ein leichter Rückgang des Anteils vitaler Zellen bei allen untersuchten Konzentrationen detektiert. Dieser betrug bei den SVEC 4-10-Zellen maximal $24 \pm 17 \%$ ($0,5 \mu\text{M}$) und bei den J 774-Zellen maximal $29 \pm 6 \%$ ($50 \mu\text{M}$).

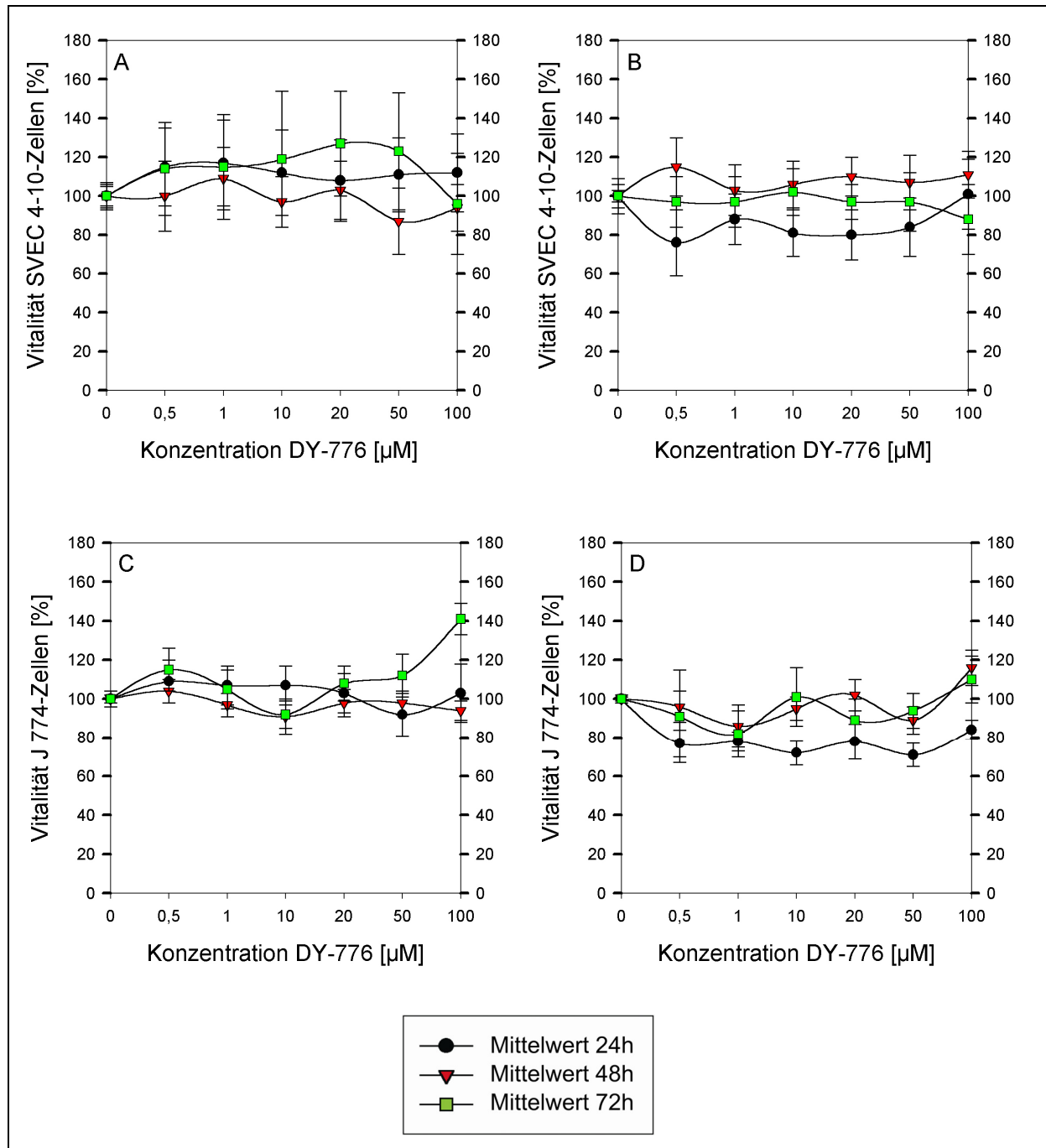


Abb. 17 Vitalität der SVEC 4-10-Zellen (A/B) und der J 774-Makrophagen (C/D) 24, 48 und 72 Stunden nach Behandlung der Zellpopulationen mit **DY-776** in definierten Konzentrationen von 0,5 μM bis 100 μM. Die ausgewerteten Ergebnisse der zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuche sind nebeneinander dargestellt. Mittelwert und Standardabweichung einer Versuchsreihe wurden aus jeweils sechsfachen Ansätzen (1×6) bestimmt. Die Zellvitalität der unbehandelten Kontrolle (0 μM) wurde stets 100 % gesetzt und zur besseren Veranschaulichung mit aufgeführt.

4.4.2.3 Zytotoxizität der S-Farbstoffe

In den Experimenten konnte festgestellt werden, dass die untersuchten Vertreter der **S-Serie** ein unterschiedlich hohes zytotoxisches Potential auf ihre biologische Umgebung haben.

Die Untersuchungen des Farbstoffes **S 0121** zeigten in den Konzentrationen von 0,5 μM bis 50 μM keine Beeinträchtigung der Vitalität der Endothelzellen im Ansatz (maximaler Abfall $15 \pm 13 \%$). Bei einer Konzentration von 100 μM S 0121 wurde jedoch in beiden Versuchsreihen mit zunehmender Inkubationsdauer ein Rückgang des Anteils lebender Zellen in der Population festgestellt. Nach 72 Stunden war die Vitalität der SVEC 4-10-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um $37 \pm 8 \%$ bzw. $17 \pm 11 \%$ abgefallen (Abb. 18A/B).

Bei den Makrophagen (Abb. 18C/D) wurden mit fortschreitender Inkubationszeit und bis zu einer Konzentration von 50 μM **S 0121** ebenfalls nahezu konstante Zellvitalitäten (maximaler Abfall $19 \pm 15 \%$) beobachtet. Nur bei einer Farbstoffkonzentration von 10 μM konnte im Wiederholungsversuch nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden ein Rückgang des Anteils lebender Zellen in der Population um $85 \pm 19 \%$ detektiert werden (Abb. 18D). Dieses Ergebnis hatte sich in der ersten Versuchsreihe nicht gezeigt (Abb. 18C). Im Bereich der höchsten getesteten Konzentration (100 μM) war in beiden Experimenten ein zeitabhängiger Abfall der Vitalität der J 774-Makrophagen zu verzeichnen. Nach 24-stündiger Inkubation mit S 0121 zeigte sich ein Rückgang der Zellvitalität im Versuchsansatz um $48 \pm 4 \%$ bzw. $57 \pm 5 \%$, nach 72 Stunden um bereits $81 \pm 3 \%$ bzw. $89 \pm 5 \%$.

Im Vergleich reagierte die J 774-Zelllinie sensibler auf den Farbstoff S 0121 als die Endothelzellen der SVEC 4-10-Zelllinie.

Der Farbstoff S 0121 zeigte insgesamt ein geringeres zytotoxisches Potential als die Referenzsubstanz Indocyaningrün.

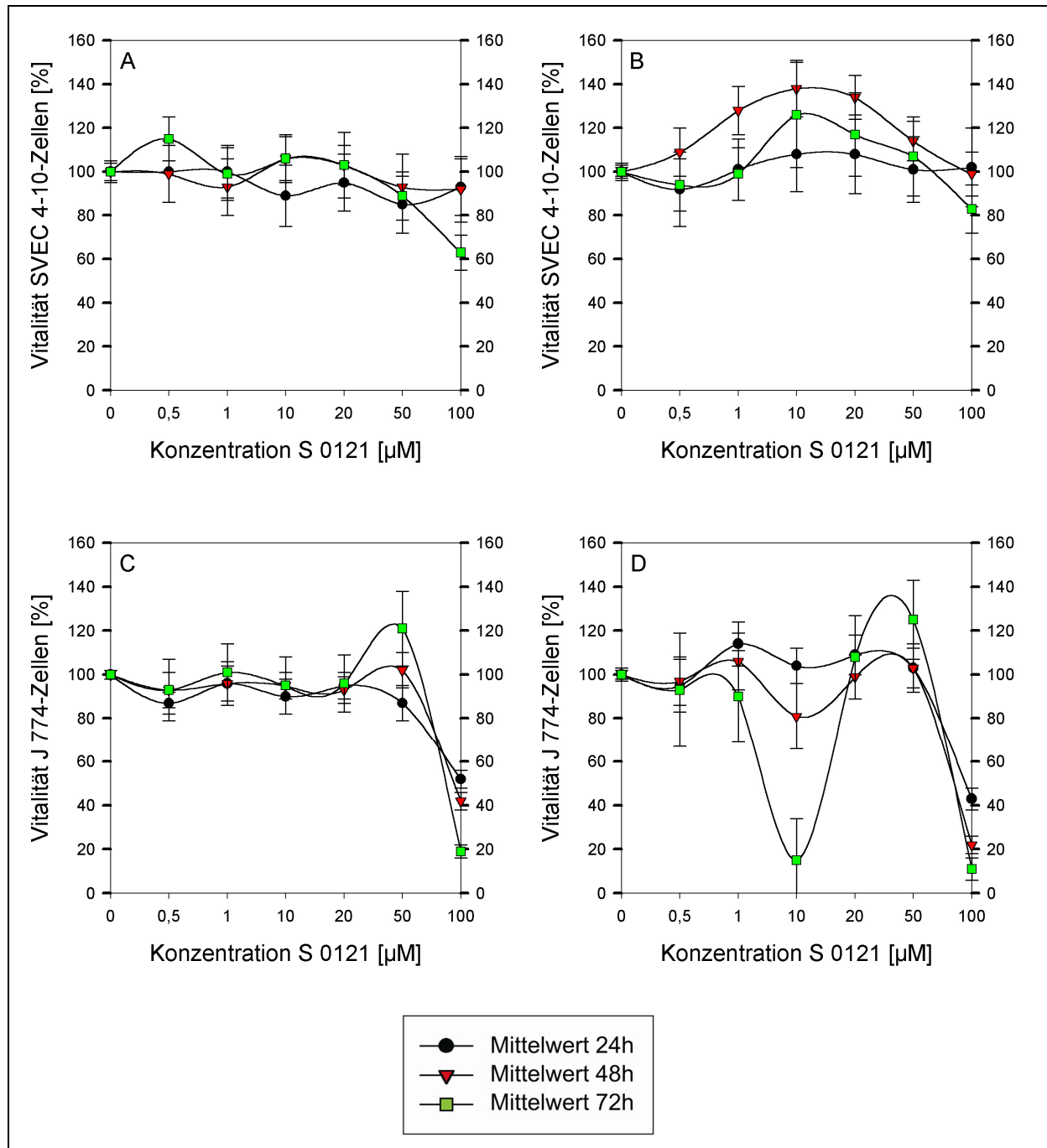


Abb. 18 Vitalität der SVEC 4-10-Zellen (A/B) und der J 774-Makrophagen (C/D) 24, 48 und 72 Stunden nach Behandlung der Zellpopulationen mit **S 0121** in definierten Konzentrationen von 0,5 μ M bis 100 μ M. Die ausgewerteten Ergebnisse der zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuche sind nebeneinander dargestellt. Mittelwert und Standardabweichung einer Versuchsreihe wurden aus jeweils sechsfachen Ansätzen (1×6) bestimmt. Die Zellvitalität der unbehandelten Kontrolle (0 μ M) wurde stets 100 % gesetzt und zur besseren Veranschaulichung mit aufgeführt.

Das Fluorochrom **S 0306** zeigte einen nachweisbaren Einfluss der Konzentration auf die Vitalität der Zellen beider untersuchter Zelllinien ($p < 0,001$).

Der Anteil lebender SVEC 4-10-Zellen ging in den Versuchsansätzen mit Konzentrationen über 10 μM **S 0306** deutlich zurück (Abb. 19A/B). Bei 20 μM verstärkte sich der Abfall der Zellvitalität noch mit fortschreitender Inkubationszeit und lag im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei $32 \pm 7 \%$ bzw. $25 \pm 14 \%$ nach 24 Stunden und bei $98 \pm 2 \%$ bzw. $100 \pm 2 \%$ nach 72 Stunden. In den höchsten getesteten Konzentrationen (50 μM und 100 μM) fiel die Vitalität der Endothelzellen unabhängig von der Inkubationsdauer signifikant um $81 \pm 4 \%$ bis $100 \pm 1 \%$ ab ($p < 0,001$).

Der Abfall der Zellvitalität der Makrophagen in den mit **S 0306** behandelten Ansätzen war im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bereits ab einer Farbstoffkonzentration von 10 μM deutlich zu erkennen ($p < 0,001$). Im Konzentrationsbereich von 10 μM bis 100 μM lag der Rückgang der Vitalität der J 774-Zellen in beiden Versuchsreihen unabhängig von der Inkubationszeit ($p = 0,285$) zwischen $86 \pm 6 \%$ und $100 \pm 1 \%$ (Abb. 19C/D). Eine Ausnahme bildete lediglich der im Wiederholungsversuch (Abb. 19D) ermittelte Abfall der Zahl lebender Zellen bei einer Konzentration von 10 μM **S 0306** nach 24 (um $32 \pm 7 \%$) und 72 Stunden (um $39 \pm 20 \%$).

Die Makrophagen zeigten gegenüber dem Fluoreszenzfarbstoff **S 0306** eine wesentlich höhere Sensitivität als die Endothelzellen.

Das organische Lösungsmittel DMSO führte im Kontrollansatz in der Konzentration von maximal 0,1 % zu keinem nachweislichen Abfall der Vitalität der Zellpopulationen beider Zelllinien.

Das Fluorochrom **S 0306** erwies sich in den Untersuchungen als deutlich zytotoxischer als alle anderen getesteten Farbstoffe, einschließlich des Indocyaningrüns.

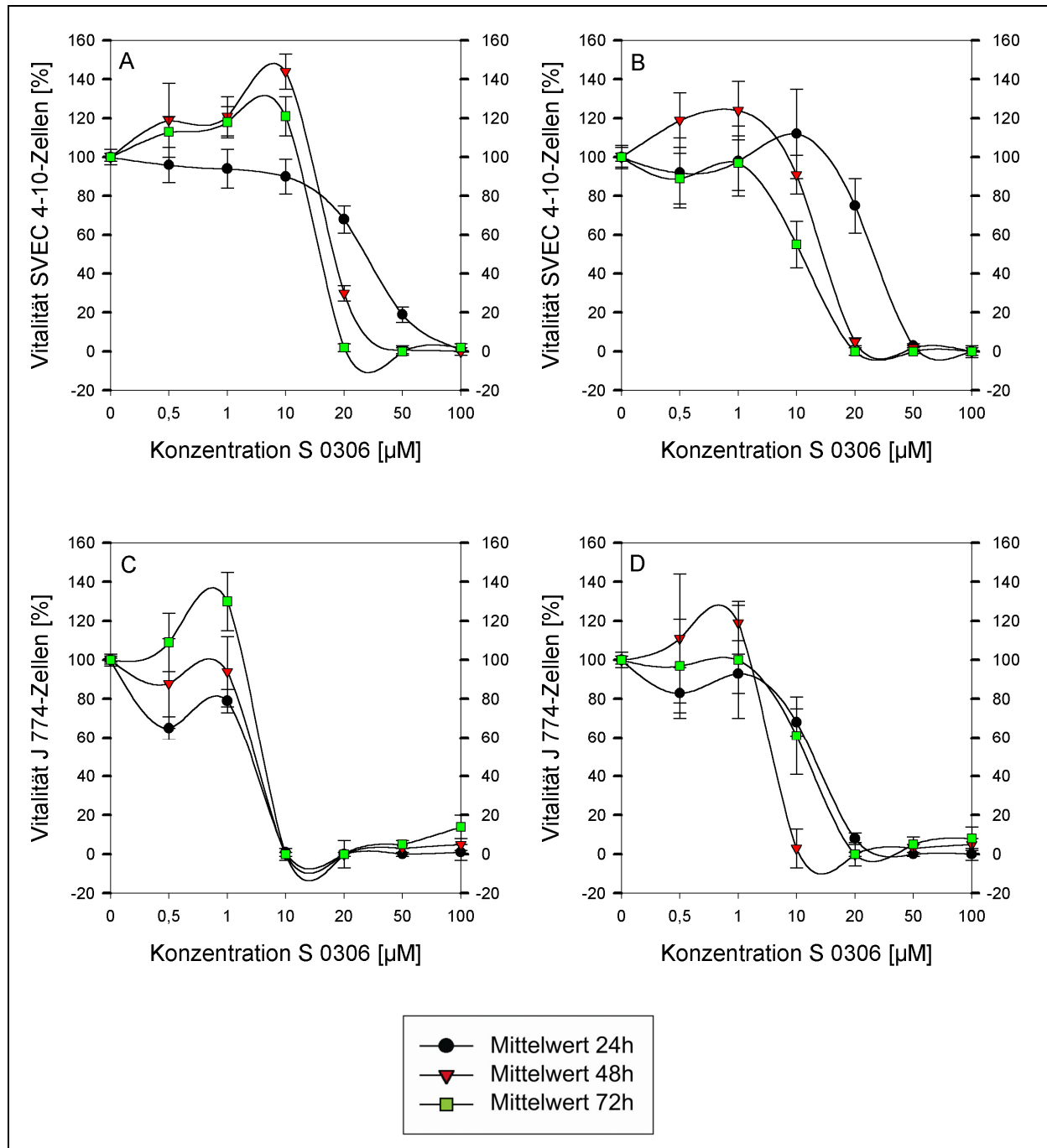


Abb. 19 Vitalität der SVEC 4-10-Zellen (A/B) und der J 774-Makrophagen (C/D) 24, 48 und 72 Stunden nach Behandlung der Zellpopulationen mit **S 0306** in definierten Konzentrationen von 0,5 μM bis 100 μM. Die ausgewerteten Ergebnisse der zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuche sind nebeneinander dargestellt. Mittelwert und Standardabweichung einer Versuchsreihe wurden aus jeweils sechsfachen Ansätzen (1×6) bestimmt. Die Zellvitalität der unbehandelten Kontrolle (0 μM) wurde stets 100 % gesetzt und zur besseren Veranschaulichung mit aufgeführt.

5 Diskussion

5.1 Stabilität der NIR-Fluoreszenzfarbstoffe in Lösung

Die nach bestem Wissen erstmals durchgeführten Versuche zur Stabilität neuer Fluoreszenzfarbstoffe der **DY-Serie**, **S-Serie** und **CY-Serie** in biologischen Medien hatten das Ziel, erste Erkenntnisse über das Verhalten der Fluorochrome in Lösung unter verschiedenen Versuchsparametern zu gewinnen. Von besonderem klinischem Interesse war dabei die Stabilität der Substanzen unter *in vivo* nahen Bedingungen. **Indocyaningrün** ist hinsichtlich seiner Stabilität in wässrigem Milieu bereits gut erforscht (Gathje et al., 1970; Landsman et al., 1976). Die erneute Untersuchung des Verhaltens von ICG in Lösung unter den hier festgelegten Bedingungen machte es möglich, die Eigenschaften der NIR-Fluoreszenzfarbstoffe in biologischen Medien mit denen der klinisch etablierten Referenzsubstanz zu vergleichen. Durch den Vergleich konnte das Potential der neuen Farbstoffe in Hinblick auf einen klinischen Einsatz noch besser eingeschätzt und bewertet werden.

Die dreifach und unabhängig voneinander durchgeführten Untersuchungen unter identischen Rahmenbedingungen machten eine statistische Auswertung des Datenmaterials mit Hilfe einer univariaten Varianzanalyse mit Messwiederholung möglich.

Die Ergebnisse wurden durch die Messung des farbstoffspezifischen Absorptionsspektrums zwischen einer Wellenlänge von 450 nm und 900 nm und der Bestimmung der relativen Peakhöhe des Absorptionsmaximums über einen festgelegten Untersuchungszeitraum gewonnen (siehe 3.2.1). Laut Landsman et al. (1976) ist die Methode ein mögliches Verfahren zur Beurteilung der Stabilität von gelösten Substanzen. Folgender Zusammenhang macht dies deutlich: Nach dem Lambert-Beer-Gesetz (Rick, 1974) ist die Extinktion und damit die Absorption einer Lösung unter anderem proportional der Konzentration des darin gelösten lichtabsorbierenden Stoffes. Durch die Proportionalität dieser beiden Größen kann der Rückgang der Absorption einer Lösung bei unveränderter Schichtdicke der Messküvette mit einer Abnahme der Farbstoffkonzentration erklärt werden.

Es ist zu berücksichtigen, dass die Daten auf Versuchsansätze mit einer definierten Farbstoffkonzentration von 10 μM basieren. Ein möglicher Einfluss der Konzentration auf die Stabilität der Fluorochrome in wässriger Lösung wurde in dieser Studie nicht untersucht und macht weitere Experimente erforderlich.

5.1.1 Stabilität von Indocyaningrün

Literaturangaben zufolge ist die Stabilität von **Indocyaningrün** in wässrigem Milieu ungenügend und unterliegt stark dem Einfluss äußerer Faktoren (Gathje et al., 1970; Landsman et al., 1976). Ursächlich für die Instabilität des Farbstoffes in Lösung sind Aggregationsprozesse und damit einhergehende physiko-chemische Veränderungen (Zhou et al., 1994), die im Laufe der Zeit zu einem irreversiblen Verfall von ICG führen (Hollins et al., 1987).

5.1.1.1 Abhängigkeit der Stabilität von ICG vom Lösungsmittel

Das Verhalten von Indocyaningrün war in den Stabilitätsversuchen dieser Studie deutlich von dem umgebenden Lösungsmittel ($p < 0,001$) abhängig (siehe 4.1.1).

Unter dem Einfluss der Zeit ($p = 0,010$) kam es in Puffer innerhalb von 72 Stunden zu einem nachweisbaren Rückgang der Ausgangspeakhöhe des Absorptionsmaximums um $50 \pm 7 \%$ bei 4 °C ($p = 0,042$) bzw. um $67 \pm 10 \%$ bei 37 °C ($p = 0,047$). Bei Betrachtung der im Lambert-Beer'schen Gesetz beschriebenen Zusammenhänge ist der Abfall der Absorption auf zeitabhängige Konzentrationsänderungen zurückzuführen und lässt auf die Instabilität des Farbstoffes in diesem Lösungsmittel schließen.

In Kulturmedium war der ermittelte Unterschied zwischen der Ausgangspeakhöhe zum Zeitpunkt 0 und den relativen Absorptionspeaks nach 72 Stunden geringer als in Puffer ($14 \pm 8 \%$ bzw. $8 \pm 4 \%$ im Gegensatz zu $50 \pm 7 \%$ bzw. $67 \pm 10 \%$) und erreichte keine statistische Signifikanz ($p = 0,541$ bei 4 °C und $p = 0,380$ bei 37 °C). Unter gleichen Versuchsbedingungen kam es in diesem Lösungsmittel demnach mit fortschreitender Zeit kaum zu Veränderungen des Fluorochroms.

Gathje et al. (1970) fanden ebenfalls eine Abhängigkeit der Farbstoffstabilität von der Zusammensetzung des umgebenden Lösungsmittels. Der Verfall von niedrig konzentriertem Indocyaningrün in proteinfreier Ringer Lösung (6,5 μM) war stärker als beispielsweise in dreifach destilliertem Wasser, demineralisiertem Wasser und Lösungen mit einer verschiedenen hohen Konzentration (0,001 - 6,0 %) an humanem Serumalbumin (HSA). Als Ursache für die Instabilität des Farbstoffes in proteinfreier Lösung sehen die Autoren den direkten Einfluss der im Lösungsmittel anwesenden Ionen (Natrium-, Kalium- und Chloridionen). Auf Grund der nahezu gleichen Zusammensetzung und Konzentration (10 μM) der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Farbstoff-Puffer-Lösungen kann vermutet werden, dass die Stabilität von Indocyaningrün hier ebenfalls durch Ionen beeinflusst wurde.

Gathje et al. (1970) nahmen weiterhin an, dass der beschriebene Effekt der Ionen auf das Fluorochrom in den Lösungen mit humanem Serumalbumin (0,001 - 6,0 %) durch die Anwesenheit der Proteine unterdrückt wurde und der Farbstoff dadurch im Vergleich zu den Ergebnissen in proteinfreier Ringer Lösung eine höhere Stabilität zeigte. Konzentrationen zwischen 0,1 % und 0,5 % HSA stabilisierten das Fluorochrom dabei am optimalsten. Die Ursache der beobachteten Vorgänge in proteinreichen Lösungen ist eine unspezifische, nicht-kovalente Bindung des Indocyaningrüns an die Oberfläche der anwesenden Makromoleküle (Moody et al., 1999; Lehmann, persönliche Mitteilung). Der Farbstoff bindet dabei größtenteils an Albumin (Cherrick et al., 1960), aber auch an Lipoproteine (Baker, 1966). Das Transportprotein Albumin besitzt beispielsweise hydrophobe Taschen, in die das Indocyaningrün hineinkriechen kann und so möglicherweise vor zerstörend wirkenden Faktoren geschützt wird (Oswald et al., 1999). Neben einer Stabilisierung des ICG verhindert die Proteinbindung zudem eine Aggregation und damit zusammenhängende physiko-chemische Veränderungen der Farbstoffmoleküle (Desmettre et al. 2000). In den Experimenten dieser Studie hatte das dem Kulturmedium zugesetzte fetale Kälberserum einen Albuminanteil von 1,7 - 3,5 %. Es ist zu vermuten, dass die Serumproteine im einstelligen Prozentbereich auch hier die Farbstoffmoleküle stabilisiert haben. Diese Annahme wird zum einen durch den beobachteten schnelleren Verfall des Fluorochroms in proteinfreier, Phosphat gepufferter Salzlösung bestätigt. Zum anderen zeigte sich in Kulturmedium eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von Indocyaningrün um circa 20 nm in Bereiche höherer Wellenlängen, was die Bindung des Farbstoffes an Proteine laut Klotz et al. (1953) beweist.

5.1.1.2 Abhängigkeit der Stabilität von ICG von der Temperatur

Der Unterschied der zeitlichen Veränderungen der Stabilität von Indocyaningrün bei einer Temperatur von 4 °C bzw. 37 °C war in Puffer zwar nicht signifikant ($p = 0,428$), dennoch zeigte sich nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden bei 37 °C ein um den Faktor 1,3 höherer Verfall des Fluoreszenzfarbstoffes als bei 4 °C (siehe 4.1.1). Ähnliche Beobachtungen machten auch Saxena et al. (2003), die sich in einer Studie mit den Auswirkungen der Umgebungstemperatur auf die Stabilität des Fluorochromes im wässrigen Milieu beschäftigten. Ihre Untersuchungen in destilliertem Wasser bei Temperaturen von 8 °C, 22 °C und 42 °C zeigten bei 42 °C eine zweimal höhere Degradation von ICG als bei 8 °C (Faktor 2,04). Nach Holzer et al. (1998) beruhen die beobachteten Vorgänge nach thermischer Anregung der Farbstoffmoleküle auf deren Tendenz, Radikale zu bilden, die dann mit in der Lösung anwesenden Radikalen und Ionen reagieren und zu farblosen Reaktionsprodukten, sogenannten Leuko-Formen, zerfallen. Diese Prozesse und die zusätzlich ohnehin schon fortschreitende Degradation der Farbstoffmoleküle durch die Anwesenheit von geladenen Teilchen im Lösungsmittel sind die Ursache für den insgesamt beschleunigten Verfall des Fluorochroms. Ein ähnlicher Effekt wird nach Meinung von Holzer et al. (1998) durch Lichtexposition und die damit verbundene Exzitation der ICG-Moleküle erreicht.

In Kulturmedium war innerhalb von 72 Stunden kein Einfluss der Temperatur auf die Stabilität des Fluoreszenzfarbstoffes nachzuweisen ($p = 0,403$). Nach Meinung von Penzkofer (persönliche Mitteilung) unterdrücken die Wechselwirkungen zwischen den Proteinen des Serums und ICG nicht nur den Einfluss anwesender Ionen im Lösungsmittel, sondern auch den Effekt einer thermischen Anregung der Farbstoffmoleküle durch höhere Umgebungstemperaturen.

Insgesamt zeigte sich der Fluoreszenzfarbstoff Indocyaningrün in Kulturmedium bei einer Temperatur von 37 °C am stabilsten. Für die ebenfalls bei 37 °C in Kulturmedium durchgeführten Zytotoxizitätsexperimente war dies von großer Bedeutung. Es ist davon auszugehen, dass das Fluorochrom in den festgelegten Konzentrationen für 72 Stunden unverändert auf das Zellmaterial eingewirkt hat. Die Zytotoxizitätsstudien standen somit nicht unter dem Einfluss eines fortschreitenden Farbstoffverfalls und zeigen demnach die tatsächliche Wirkung des ICG auf die untersuchten Zelllinien.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der hier durchgeführten *in vitro* Untersuchungen die bisherigen Befunde zum Verhalten von **Indocyaningrün** in Lösung bestätigen. Die in früheren Arbeiten beschriebene Instabilität des Farbstoffes in wässrigem, proteinfreien Milieu zeigte sich auch in dieser Studie. Sie ist auf den Effekt der im Lösungsmittel enthaltenen Ionen zurückzuführen und wird durch thermische Anregung der Farbstoffmoleküle scheinbar noch verstärkt. Bedingt durch den Einfluss von Farbstoff-Protein-Wechselwirkungen war in Kulturmedium eine gute Stabilität von Indocyaningrün feststellbar. Die unspezifische, nicht-kovalente Bindung des Fluorchroms an Serumproteine des Kulturmediums verhindert nicht nur Interaktionen der Farbstoffmoleküle untereinander, sondern sie unterdrückt auch den Einfluss der in der Lösung anwesenden elektrisch geladenen Teilchen. Zusätzlich erhöht sie die Thermostabilität des Fluorchroms.

Die Kongruenz früherer Befunde mit den hier erbrachten Untersuchungsergebnissen machte das Indocyaningrün insgesamt zu einer guten Referenzsubstanz für die Stabilitätsversuche der neuentwickelten NIR-Fluoreszenzfarbstoffe.

5.1.2 Stabilität der DY-Farbstoffe

In den Versuchen mit den **DY-Farbstoffen** konnten weder in Puffer noch in Kulturmedium signifikante Veränderungen der Absorptionsmaxima der Fluorochrome innerhalb des Messzeitraumes nachgewiesen werden (siehe 4.1.2). Die beobachtete Konstanz der Absorption lässt unter Berücksichtigung des Lambert-Beer-Gesetzes auf eine hohe Stabilität der Farbstoffe schließen. Bei der Analyse des chemischen Aufbaus der Fluorochrome (siehe 3.1.5.2) zeigte sich, dass die Farbstoffmoleküle im Vergleich zum ICG neben kürzeren Polymethinketten und damit einer geringeren Anzahl an hydrophoben C-Atomen auch einen aromatischen Ring weniger aufweisen. Der mit diesen Strukturmerkmalen einhergehende hydrophilere Charakter der DY-Farbstoffe macht sie in wässrigem Milieu stabiler als die Referenzsubstanz (Wenzel, persönliche Mitteilung).

Allerdings wurde beobachtet, dass die Absorptionsmaxima aller untersuchten DY-Farbstoffe, besonders aber von DY-731 und DY-751, in beiden Lösungsmitteln bei

4 °C tendenziell stärker abfielen als bei 37 °C (Unterschied max. 10 %). Dies lässt sich damit erklären, dass es bei den DY-Farbstoffen unter dem Einfluss niedriger Temperaturen zu einer erhöhten Aggregation der Farbstoffmoleküle kommt, die einen Rückgang des Absorptionsmaximums hervorruft. Anders als beim Indocyaningrün führen die Aggregationsvorgänge allerdings letztendlich nicht zum Verfall der Farbstoffe, sondern sie sind reversibel (Wenzel, persönliche Mitteilung).

Die Erkenntnisse haben folgende praktische Konsequenz: Eine Lagerung der gelösten Fluorochrome ist generell bei Kühlschranktemperatur möglich. Jedoch sollten die Farbstoffansätze vor spektrometrischen Tests, bei denen die Höhe des Absorptionsmaximums von Relevanz ist, zum Ausschluss methodischer Fehler vor Beginn der Untersuchungen auf Raumtemperatur gebracht werden.

Durch die Stabilität der DY-Farbstoffe in Kulturmedium bei 37 °C wurde die Wirkung der Fluorochrome in den unter gleichen Bedingungen durchgeführten Zytotoxizitätsversuchen real eingeschätzt.

Zusammenfassend zeigten die *in vitro* Versuche dieser Arbeit, dass die Farbstoffe der **DY-Serie** in wässrigem Milieu stabiler sind als die Referenzsubstanz Indocyaningrün und die festgelegten äußeren Bedingungen keinen nachweisbaren Einfluss auf die Fluorochromstabilität haben. Dies ist auf die optimierte chemische Struktur (Hydrophilie) der Farbstoffmoleküle zurückzuführen.

5.1.3 Stabilität von CY 5.5

Die Stabilität von **CY 5.5** wurde hier ebenfalls erstmalig *in vitro* untersucht, obwohl die fluoro-optischen Eigenschaften des Farbstoffes bereits in Kleintieren im Rahmen der optischen Bildgebung genutzt wurden (Ballou et al., 1995; Mahmood et al., 1999; Weissleder et al., 1999; Hansch et al., 2004). Weder die Inkubationszeit ($p = 0,196$) noch das Lösungsmittel ($p = 0,817$) oder die Umgebungstemperatur ($p = 0,124$) hatten einen nachweisbaren Einfluss auf das Verhalten des Cyanins in wässrigem Milieu (siehe 4.1.3). Da die relative Peakhöhe sowohl in Puffer als auch in Kulturmedium innerhalb von 72 Stunden nicht abfiel, ist davon auszugehen, dass kein

Abbau des Fluorochroms in den biologischen Medien stattgefunden hat. Die hohe Stabilität ist wahrscheinlich auch hier durch den hydrophilen Charakter (3 Sulfonsäuregruppen, kurze Polymethinkette) des Farbstoffes bedingt (siehe 3.1.5.4). Der leichte Anstieg der Absorptionsmaxima auf über 100 % muss als methodischer Fehler bewertet werden.

Insgesamt ist das Fluorochrom **CY 5.5** in den untersuchten biologischen Medien unabhängig von den festgelegten Versuchsparametern deutlich stabiler als Indocyaningrün. Ursache für diese Beobachtung ist die verbesserte chemische Struktur des Farbstoffes. In der Studie von Weissleder et al. (1999) findet sich ein Hinweis zu einer ebenfalls hohen Stabilität des Fluorochroms in einer *in vivo* tierexperimentellen Situation. Die Autoren konnten noch 96 Stunden nach Injektion einer mit CY 5.5 gekoppelten NIRF-Sonde in tumortragende Mäuse ein deutliches Fluoreszenzsignal des Farbstoffes messen. Daraus ist zu schlussfolgern, dass der Cyaninfarbstoff über den Beobachtungszeitraum hinweg größtenteils stabil gewesen sein muss. In Anbetracht dieser Ergebnisse ist auch bei einer klinischen Anwendung von CY 5.5 eine hohe Stabilität zu erwarten.

5.1.4 Stabilität der S-Farbstoffe

Das Verhalten des Farbstoffes **S 0121** war in Puffer und Kulturmedium verschieden und macht eine Abhängigkeit der Farbstoffstabilität von der Art des Lösungsmittels deutlich ($p < 0,001$).

In proteinfreiem Puffer zeigte das Fluorochrom bei 37 °C einen Abfall der relativen Peakhöhe von 100 % auf 73 %, der fast statistische Signifikanz erreichte ($p = 0,051$). Dagegen waren die Absorptionswerte bei 4 °C über 72 Stunden nahezu konstant (siehe 4.1.4). Analog zur Referenzsubstanz Indocyaningrün ist die Stabilität von S 0121 im proteinfreien Lösungsmittel abhängig von der Temperatur ($p = 0,001$). Über die Ursachen des schnelleren Verfalls bei höheren Temperaturen kann im Rahmen dieser Arbeit nur spekuliert werden. Denkbar ist, dass die von Holzer et al. (1998) für ICG beschriebenen Vorgänge (siehe 5.1.1.2) auch bei S 0121 zu einer

Beschleunigung von physiko-chemischen Veränderungen und letztendlich zu dem schnelleren Verfall des Farbstoffes nach thermischer Anregung führte.

In Kulturmedium wurde innerhalb des 72-stündigen Messzeitraumes bei den untersuchten Temperaturen kein Abfall des Absorptionsmaximums von S 0121 beobachtet. Das Fluorochrom war demnach stabil. Auch hier können Parallelen zum ICG gezogen werden. Die schon bei der Referenzsubstanz diskutierte nicht-kovalente Bindung an makromolekulare Serumbestandteile ist vermutlich auch bei S 0121 Grund für die höhere Stabilität der Farbstoffmoleküle in dem proteinreichen Lösungsmittel (Lehmann, persönliche Mitteilung). Diese Annahme scheint sowohl durch die beobachtete Verschiebung des Absorptionsmaximums in den Bereich höherer Wellenlängen als auch durch die hohe Thermostabilität des Fluorochroms bei 37 °C in Kulturmedium bestätigt zu werden. Der Anstieg der relativen Peakhöhe in Kulturmedium auf über 100 % ist wahrscheinlich auch hier als Pipettierfehler zu interpretieren.

Der NIR-Fluoreszenzfarbstoff **S 0306** fiel innerhalb der ersten 24 Stunden in Puffer sowohl bei 4 °C als auch bei 37 °C aus (siehe 4.1.4). Strukturell weist der Farbstoff (siehe 3.1.5.3) im Vergleich zu den Fluorochromen der DY-Serie und S 0121 eine höhere Lipophilie auf (längere Polymethinkette, zusätzlicher aromatischer Ring). Das Fluorochrom ist auf Grund eines weiteren Cyclohexanrings in der Cyaninkette ebenfalls lipophiler als Indocyaningrün. S 0306 besitzt demnach von allen getesteten Farbstoffen die höchste Lipophilie. Zum Ausfallen in Puffer kam es, weil das Fluorochrom wegen seines chemischen Charakters zur Herstellung der Lösungsansätze in dem organischen Lösungsmittel DMSO angelöst werden musste und erst dann in wässrigem Puffer aufgenommen werden konnte (siehe 3.2.1). Die Konzentration von S 0306 in der Phosphat gepufferten Salzlösung war gering und sie enthielt keine Proteine, die die Löslichkeit des Farbstoffes verbesserten. Demzufolge lag keine echte Lösung, sondern eher eine Emulsion vor (Lehmann, persönliche Mitteilung). Dies bewirkte, dass das Fluorochrom S 0306 im Laufe von 24 Stunden ausfiel und als Niederschlag am Boden der Messküvette zu erkennen war.

In Kulturmedium zeigte sich die Farbstofflösung noch nach 72 Stunden homogen. Dieses Ergebnis basiert vermutlich auf dem stabilisierenden Einfluss der anwesenden Serumproteine auf das Fluorochrom.

Wie auch bei den anderen untersuchten Farbstoffen schaffte die Stabilität von S 0121 und S 0306 in Kulturmedium bei 37 °C die Voraussetzung für die Durchführung der Zytotoxizitätsversuche und die Einschätzung der tatsächlichen Wirkung der Fluorochrome auf die ausgewählten Zelllinien.

Zusammenfassend zeigte sich, dass das Verhalten der NIR-Farbstoffe der S-Serie in wässriger Lösung zum einen von der chemischen Struktur der Fluorochrome und zum anderen deutlich von äußeren Parametern, wie der Inkubationszeit, dem umgebenden Lösungsmittel und der Temperatur abhängt. Der Farbstoff S 0121 ist in beiden untersuchten Lösungsmitteln stabiler als Indocyaningrün. Die Stabilität des Fluorochroms S 0306 ist in Kulturmedium mit der Stabilität von ICG vergleichbar. In Phosphat gepufferter Salzlösung zeigt sich der Farbstoff dagegen weniger stabil als die Referenzsubstanz.

5.1.5 Fazit aus den Stabilitätsversuchen der NIR-Farbstoffe

Die NIR-Farbstoffe der DY-Serie und S-Serie wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal hinsichtlich ihrer *in vitro* Stabilität in wässrigem Milieu untersucht. Auch das Verhalten von CY 5.5 in Lösung wurde hier erstmalig in Zellkulturexperimenten beurteilt, obwohl die fluoro-optischen Eigenschaften des Farbstoffes bereits in Kleintieren im Rahmen der optischen Bildgebung genutzt wurden (Ballou et al., 1995; Mahmood et al., 1999; Weissleder et al., 1999; Hansch et al., 2004). Die experimentelle Situation in Kulturmedium bei 37 °C war der *in vivo* Situation in Vollblut hinsichtlich Zusammensetzung (Proteinanteil), Temperatur (37 °C) und pH-Wert (Vollblut: 7,41; Kulturmedium: 7,5) sehr ähnlich. Die Versuche zeigten, dass die neuen Fluoreszenzfarbstoffe in dieser *in vivo* nahen Umgebung eine genauso hohe oder bessere Stabilität wie die klinisch etablierte Referenzsubstanz Indocyaningrün besitzen. Ob die Fluorochrome auch im lebenden Organismus über den hier untersuchten Zeitraum hinweg stabil sind und sie ihre fluoro-optischen Eigenschaften beibehalten, kann nur anhand weiterer experimenteller und klinischer *in vivo* Studien erwiesen werden.

5.2 Rahmenbedingungen der Zytotoxizitätsversuche- Ermittlung geeigneter Aussaatzellzahlen

Die Versuchsreihe hatte das Ziel, individuelle Wachstumskurven der SVEC 4-10-Zellen und J 774-Zellen für verschiedene Wachstumszeiten zu bestimmen und anhand der Ergebnisse geeignete Aussaatzellzahlen für die Zytotoxizitätsversuche festzulegen.

Es zeigte sich eine Abhängigkeit der mit Hilfe des Methyl-Tetrazolium-Testes (siehe 3.2.3.1 und 3.2.3.2) bei einer Wellenlänge von 492 nm photometrisch bestimmten Enzymaktivität zellulärer Dehydrogenasen von der Aussaatzellzahl und der Inkubationszeit (siehe 4.3). Die für jede Zellzahl aus sechsfach geführten Ansätzen (1×6) gebildeten Mittelwerte und niedrigen Standardabweichungen erlaubten eine Nutzung der gewonnenen Daten. Sowohl die Enzymaktivität als auch die Größe der Zellpopulation erreichte mit zunehmender Aussaatzellzahl und fortschreitender Inkubationszeit eine Sättigung. Um zu gewährleisten, dass die Fluoreszenzfarbstoffe an konfluenten, sich jedoch noch nicht in der stationären Wachstumsphase befindenden Zellkulturen getestet wurden, erfolgte die Zellaussaat in den Zytotoxizitätsversuchen strikt in Anlehnung an den linearen Bereich zwischen Enzymaktivität und Zellzahl (siehe 3.2.4.2 und 4.3). Eine Beeinträchtigung der Zellvitalität durch zu hohe Zelldichten in den Versuchsansätzen ist demnach auszuschließen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Zellzahlen in den Zytotoxizitätsversuchen so gewählt wurden, dass die Wachstumsrate der Zellen nach entsprechender Kulturdauer noch im linearen Bereich liegt. Die ermittelten Zytotoxizitäten beruhen deswegen alleine auf der Wirkung der getesteten Fluoreszenzfarbstoffe und nicht auf einem natürlichen Zelltod, beispielsweise auf Grund von Platzmangel in den Wells der Mikrotiterplatten oder Medienverbrauch.

5.3 Zytotoxizität der NIR-Fluoreszenzfarbstoffe

Die Zytotoxizitätsversuche dieser Studie hatten das Ziel, Zellen verschiedener Zelllinien (SVEC 4-10-Zelllinie und J 774-Zelllinie) mit neuen NIR-Fluorochromen der DY-Serie und S-Serie zu behandeln und ihre Wirkung auf die Zellvitalität *in vitro* im Vergleich zur Referenzsubstanz Indocyaningrün zu evaluieren. Anhand der gewonnenen Daten sollte erstmals eingeschätzt werden, ob ein klinischer Einsatz der neuen Farbstoffe im Bereich der optischen Bildgebung unter Berücksichtigung ihrer Wirkung auf das biologische Umfeld realisierbar ist.

In den Untersuchungen zeigte sich eine unterschiedlich starke Beeinträchtigung der Vitalität der behandelten Zellpopulationen durch die getesteten NIR-Fluoreszenzfarbstoffe. Je nach Fluorochrom war die Wirkung abhängig von der Konzentration, der Inkubationszeit und der Zelllinie.

Bei der Auswertung der mit jedem Farbstoff zweimal durchgeführten Zytotoxizitätsversuche (2×6 Ansätze pro Farbstoff und Konzentration) wurden Schwankungen im Datenmaterial deutlich, weswegen die Ergebnisse getrennt ausgewertet (siehe 3.2.4.3) und dargestellt wurden (siehe 4.4.2).

Da alle Untersuchungen unter immer gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, sind diese Beobachtungen und Ergebnisse unter anderem auf Unterschiede des Zellwachstums zurückzuführen. Mögliche biologische Gründe dafür sind zum Beispiel die unterschiedlich hohen Passagezahlen der verwendeten Zellen, da älter werdende oder schon zu lange in Kultur gewesene Zellen ihr Wachstum oftmals verlangsamen. Außerdem sind natürliche Wachstumsschwankungen zu berücksichtigen, denen Zellen als „lebendes Biomaterial“ immer unterliegen können.

Methodisch kann es durch die fehlerbehaftete Zellzählung mittels Zählkammer zu verschieden hohen Ausgangszellzahlen und damit einem unterschiedlich schnellen Wachstum in den Versuchsansätzen gekommen sein. Auch die verschieden gute Durchmischung der Zellsuspensionen in den für die Mehrkanalpipette geeigneten Reagenzreservoirs vor der Aussaat kann abweichende Zellzahlen im Ansatz hervorgerufen haben. In diesem Zusammenhang sind grundsätzlich ebenso Fehler, die beim Pipettieren der Zellsuspensionen und der Farbstoffe aufgetreten sein können, zu berücksichtigen.

Eine Unterschätzung der Farbstoffzytotoxizität durch den Einfluss der Eigenabsorption der getesteten Fluorochrome ist ebenfalls auszuschließen, da diese Größe im Vorfeld der Studien für alle Farbstoffe bei einer Wellenlänge von 492 nm (= Absorptionsmaximum des im MTT gebildeten Formazanproduktes) bestimmt (siehe 3.2.4.1 und 4.4.1) und mit den entsprechenden Absorptionen der Zytotoxizitätsversuche verrechnet wurde. Die Ergebnisse jedes Zytotoxizitätsversuches basieren demnach auf Daten nach Abzug der aus jeweils sechsfachen Ansätzen (1×6) ermittelten Farbstoffeigenabsorption im entsprechenden Kulturmedium. Die Standardabweichungen waren niedrig und rechtfertigten die Nutzung der Daten. Der tatsächliche zytotoxische Effekt der einzelnen Farbstoffe konnte somit korrekt eingeschätzt werden.

Die Untersuchungen zeigten bei allen Farbstoffen einen Anstieg der Eigenabsorption mit steigender Konzentration im Kulturmedium. Besonders auffallend waren die hohen Absorptionswerte des Farbstoffes DY-681 (siehe 4.4.1). Diese sind auf die Tatsache zurückzuführen, dass das Absorptionsmaximum von DY-681 (681 nm) von allen untersuchten Fluorochromen am dichtesten an der Wellenlänge von 492 nm liegt.

5.3.1 Zytotoxizität von Indocyaningrün

Die Experimente mit **Indocyaningrün** zeigten eine Abhängigkeit der Vitalität der SVEC 4-10-Zellen von der Farbstoffkonzentration (siehe 4.4.2.1). Nach Behandlung der Zellpopulationen mit hohen Konzentrationen (50 μ M und 100 μ M) kam es zu einem Rückgang des Anteils lebender Zellen in den Ansätzen, der im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zwischen $9 \pm 6 \%$ und $28 \pm 15 \%$ (50 μ M) bzw. zwischen $22 \pm 8 \%$ und $40 \pm 3 \%$ (100 μ M) lag. Der beobachtete Abfall der Zellvitalität führt zu der Schlussfolgerung, dass ICG im Bereich von 50 μ M und 100 μ M zytotoxisch auf die Endothelzellen wirkte. Anhand folgender Überlegungen kann versucht werden, diese Zytotoxizität zu erklären: Auf Grund des lipophilen Charakters des Farbstoffes (siehe 3.1.5.1) können theoretisch verschiedene Toxizitätsmechanismen zum Tod der untersuchten Zellen geführt haben. Zum einen müssen unspezifische Interaktionen mit den Zellen diskutiert werden. Diese können einerseits auf Membranebene angreifen und durch auftretende Desorientierungen der Lipide innerhalb der lipophilen

Bilayer-Struktur zu einer Schädigung bzw. dem Funktionsverlust der Membranbarriere führen (Cascorbi & Foret, 1991). Andererseits ist es möglich, dass sich das lipophile Indocyaningrün nach Überwindung der Zellmembran in der Zelle anreichert und so zu intrazellulären Schäden geführt hat. Generell wird die Toxizität bei unspezifisch wirkenden Substanzen allein durch die physiko-chemische Eigenschaft der Lipophilie bestimmt. Das heißt, je lipophiler die Substanz ist, desto toxischer wirkt sie (Saito et al., 1993; Halle et al., 1991).

Es ist auch denkbar, dass der beobachtete Zelltod durch spezifische Wirkmechanismen des ICG, zum Beispiel durch Wechselwirkungen mit speziellen Biomolekülen in der Zelle, hervorgerufen wurde. In diesem Fall wäre die Lipophilie der Substanz mit ein Faktor, der das Eindringen in die Zelle und die Entfaltung einer spezifischen Wirkung bzw. Schädigung begünstigt. Da die Toxizitätsmechanismen des Indocyaningrün nach bestem Wissen bisher und auch in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht wurden, sind die Erklärungsversuche spekulativ. Welche Prozesse nach Behandlung der Zellen mit dem Farbstoff wirklich zum Zelltod führten, kann nur durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden.

Die Zellvitalität der Makrophagen (J 774-Zelllinie) stand ebenfalls unter dem Einfluss der Farbstoffkonzentration von Indocyaningrün ($p < 0,001$). Ein signifikanter Rückgang des Anteils vitaler Zellen in der Population ($\max. 88 \pm 6 \%$) war im Gegensatz zu den Endothelzellen der SVEC 4-10-Zelllinie bereits bei mittleren Farbstoffkonzentrationen ($10 \mu\text{M}$ und $20 \mu\text{M}$) nachzuweisen ($p = 0,033$). Dabei war feststellbar, dass die Vitalität der Makrophagen stärker abnahm als die der Endothelzellen (siehe 4.4.2.1). Beispielsweise zeigte sich 24 Stunden nach Behandlung der Zellpopulationen mit einer $50 \mu\text{M}$ ICG-Lösung ein Abfall der Zellvitalität der SVEC 4-10-Zellen um $18 \pm 16 \%$ bzw. $28 \pm 15 \%$ und der J 774-Makrophagen um $47 \pm 4 \%$ bzw. $57 \pm 4 \%$. Im Vergleich dazu beobachteten die Autoren Fickweiler et al. (1997) nach 24-stündiger Inkubation einer immortalisierten humanen Keratinozytenzelllinie (HaCaT) mit einer $50 \mu\text{M}$ ICG-Lösung eine Abnahme der Zellvitalität um 18% . Die Ergebnisse machen eine unterschiedlich hohe Sensitivität der untersuchten Zelllinien auf Indocyaningrün deutlich. Unterschiede in der Empfindlichkeit verschiedener Zellen (humane Fibroblasten, immortalisierte Li-Fraumeni-Syndrom-Zellen, 3 humane Tumorzelllinien) auf einen exogenen chemischen Reiz werden auch in einer Studie von Tong et al. (2001) zur Zytotoxizität eines zur photo-dynamischen Therapie eingesetzten Fluorochroms

(Nil Blau A) beschrieben. Die Autoren fanden heraus, dass die verschieden starke Wirkung des Nil Blau A unter anderem durch eine unterschiedlich hohe Farbstoffaufnahme der Zellen hervorgerufen wurde. Ob die in der vorliegenden Studie beobachtete stärkere zytotoxische Wirkung von Indocyaningrün auf die J 774-Makrophagen in Zusammenhang mit einer erhöhten zellspezifischen Farbstoffaufnahme durch die zur Phagozytose befähigten Zellen steht, sollte daher in weiteren Versuchen geklärt werden. Zu diesem Zweck wäre beispielsweise eine FACS-Analyse durchführbar, wie von Hansch et al. (2004) beschrieben.

Weiterhin ließ sich in den Versuchen kein Einfluss der Inkubationszeit auf den Anteil lebender Endothelzellen in der untersuchten Population ($p = 0,431$) nachweisen. Demnach entwickelte sich die beobachtete Zytotoxizität von Indocyaningrün auf die SVEC 4-10-Zellen in hohen Konzentrationen bereits innerhalb von 24 Stunden. Einen zytotoxischen Effekt des Farbstoffes in demselben Untersuchungszeitraum beschreibt auch die Studie von Fickweiler et al. (2003).

Im Gegensatz dazu kam es bei den J 774-Zellen zu einer tendenziellen Verstärkung der zytotoxischen Wirkung des Fluorochroms mit fortschreitender Inkubationszeit. Dies steht möglicherweise im Zusammenhang mit der zunehmenden intrazellulären Anreicherung des Farbstoffes. Insgesamt erreichte der Einfluss der Zeit auf die Zellvitalität jedoch keine Signifikanz ($p = 0,112$).

Die beschriebenen Beobachtungen zur Zytotoxizität von Indocyaningrün basierten in dieser Studie auf Versuchsansätzen, zu deren Herstellung der Farbstoff in dem organischen Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) angelöst wurde (siehe 3.2.1). Da DMSO laut Literaturangaben (Zeeck et al., 1992) leicht toxisch ist, wurde in den Experimenten eine zusätzliche Kontrolle (Kulturmedium mit Zellen und DMSO) mitgeführt. In Übereinstimmung mit einer persönlichen Mitteilung von PD Dr. Hilger zeigte sich, dass das Lösungsmittel in der Konzentration von 0,1 % im Ansatz keine zytotoxische Wirkung auf die eingesäten Zellen hatte. Da diese Konzentration von DMSO in allen Versuchsansätzen nicht überschritten wurde, beruhen die Ergebnisse der Zytotoxizitätsversuche mit Indocyaningrün ausschließlich auf der Wirkung des Farbstoffes.

Insgesamt lässt sich sagen, dass ein bereits in der Literatur beschriebenes konzentrationsabhängiges zytotoxisches Potential von Indocyaningrün auch in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit gefunden wurde. Eine zytotoxische Wirkung des Indocyaningrüns auf die untersuchten Zellpopulationen wurde in der vorliegenden Arbeit ab mittleren Konzentrationen (10 μ M bzw. 20 μ M) detektiert. In klinisch bisher eingesetzten nanomolaren bzw. niedrig mikromolaren Konzentrationen zeigte das Fluorochrom jedoch keine Zytotoxizität auf die biologische Umgebung. Die Wirkung von Indocyaningrün auf unterschiedliche Zell- bzw. Gewebetypen kann allerdings verschieden stark sein.

5.3.2 Zytotoxizität der DY-Farbstoffe

In den Untersuchungen der Farbstoffe der **DY-Serie** kam es weder bei den Endothelzellen noch bei den Makrophagen zu einer nachweisbaren Abnahme der Vitalität mit fortschreitender Inkubationszeit und steigender Farbstoffkonzentration (siehe 4.4.2.2). Daraus ist zu schlussfolgern, dass die Fluorochrome unter den festgelegten Rahmenbedingungen nicht zytotoxisch auf die untersuchten Zellpopulationen wirkten. Unter Berücksichtigung der Studien von Saito et al. (1993) und Halle et al. (1991) und den damit bei Indocyaningrün bereits beschriebenen Zusammenhängen (siehe 5.3.1) ist die im Vergleich zur Referenzsubstanz bessere Verträglichkeit der DY-Farbstoffe mit ihrem hydrophileren Charakter zu erklären (siehe 3.1.5.2). Dass die Verträglichkeit von chemischen Substanzen durch eine hohe Hydrophilie gesteigert wird, zeigte auch ein Vergleich von verschiedenen Cyaninfarbstoffen durch Riefke et al. (1996). Die von den Autoren bestimmte LD₅₀-Dosis in Mäusen lag bei den hydrophilen Farbstoffen bis zu 60fach höher als bei Indocyaningrün.

Schwankungen der Ergebnisse waren beispielsweise in den Untersuchungen des Farbstoffes DY-681 zu erkennen. Im ersten Versuch mit der SVEC 4-10-Zelllinie fiel der Anteil lebender Endothelzellen im Ansatz mit fortschreitender Inkubationsdauer und zunehmender Farbstoffkonzentration tendenziell ab (siehe 4.4.2.2). In der zweiten Versuchsreihe wurde diese Tendenz jedoch nicht bestätigt. Die Zellvitalität war nahezu konstant. In der statistischen Analyse konnte ebenfalls kein Einfluss der Farbstoffkonzentration ($p = 0,319$) und der Inkubationszeit ($p = 0,565$) auf die Vitalität

der Endothelzellen in der Population nachgewiesen werden. Inwieweit der Farbstoff DY-681 also tatsächlich eine zytotoxische Wirkung auf die SVEC 4-10-Zellen hatte oder ob die Ursache der Beobachtungen ein methodischer Fehler war, kann anhand der beiden durchgeführten Versuchsreihen nicht eindeutig beurteilt werden. Hier bedarf es weiterer Untersuchungen.

Auch in den Versuchen mit dem Farbstoff DY-731 wurden bei den SVEC 4-10-Zellen teilweise Schwankungen der beobachteten Zellvitalitäten gefunden (siehe 4.4.2.2). In einer der beiden Versuchsreihen zeigte sich bei der Konzentration von 0,5 μM DY-731 eine starke zytotoxische Wirkung auf die Endothelzellen im Ansatz, die sich mit fortschreitender Inkubationszeit tendenziell verstärkte. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war die Zellvitalität bereits nach 24 Stunden um $74 \pm 14 \%$ abgefallen. Eine Abnahme des Anteils lebender Zellen in der Population konnte auch bei einer Farbstoffkonzentration von 1 μM nach 72-stündiger Inkubation beobachtet werden ($54 \pm 26 \%$). Im Wiederholungsversuch wurde allerdings in beiden Fällen keine zytotoxische Wirkung von DY-731 auf die SVEC 4-10-Zellen festgestellt. Da es auch in höheren Farbstoffkonzentrationen (10 μM bis 100 μM) zu keinem Rückgang der Zellvitalität in den Ansätzen kam, ist anzunehmen, dass Pipettierfehler ursächlich für die unerwarteten Beobachtungen waren.

In den Zytotoxizitätsversuchen aller DY-Farbstoffe fiel auf, dass die errechnete Zellvitalität nach Farbstoffbehandlung im Vergleich zur mitgeführten unbehandelten Kontrolle häufig Werte über 100 % erreichte. Unter Berücksichtigung der chemischen Struktur der Farbstoffe ist eine wachstumsfördernde Wirkung auf die Zellen unwahrscheinlich (Lehmann, persönliche Mitteilung). Ein solcher Zusammenhang wurde bisher auch nicht in der Literatur beschrieben und müsste genauer untersucht werden. Der Anstieg der Zellvitalität auf über 100 % kann nach bestem Wissen deshalb ebenfalls nur als methodischer Fehler bewertet werden.

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen, dass die getesteten Farbstoffe der **DY-Serie** weitaus weniger toxisch sind als Indocyaningrün.

Anhand der Ergebnisse der Zytotoxizitätsversuche der vorliegenden Arbeit lässt sich sagen, dass eine Anwendung der DY-Farbstoffe in der optischen Bildgebung potentiell vorstellbar ist. Durch die hier erwiesene hohe *in vitro* Verträglichkeit der Farbstoffe

bei ausgesuchten Zelllinien wurde ein erster Schritt in Richtung eines klinischen Einsatzes der NIR-Fluorochrome gemacht. Zur Realisierung einer angestrebten Anwendung der Substanzen als optische Kontrastmittel müssen allerdings noch weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden. Es gilt zu klären, welche Konzentrationen der Farbstoffe für eine erfolgreiche Darstellung einer Zielregion *in vivo* benötigt werden und ob diese für den lebenden Organismus verträglich sind. Mögliche klinisch relevante Konzentrationen können bisherigen Studien über den Einsatz von Indocyaningrün im Bereich der optischen Bildgebung entnommen werden. Beispielsweise injizierten Licha et al. (2000) in Experimenten zur fluoro-optischen Bildgebung Farbstoffdosen von 0,5 μM ICG/kg Körpergewicht in tumortragende Mäuse. Mit einer intravenösen Dosis von 0,3 μM /kg Körpergewicht erzielten Ntziachristos et al. (2000) im Rahmen einer durch Indocyaningrün verstärkten diffusen optischen Tomographie (DOT) ein leicht zu detektierendes Signal. Reynolds et al. (1999) gelang die Darstellung von Mammatumoren im Hund mit Hilfe von ICG in der Konzentration von 1,3 μM /kg Körpergewicht. Den erfolgreichen klinischen Einsatz des Farbstoffes zur optischen Darstellung von Hirntumoren beschreiben Haglund et al. (1996). Die Autoren konnten ebenfalls mit einer intravenös verabreichten, niedrigen Fluorochromkonzentration von 1,3 μM /kg Körpergewicht Tumore genau lokalisieren sowie klassifizieren und Überreste tumorösen Gewebes an den Resektionsrändern erkennen. Erste *in vivo* Versuche mit den DY-Farbstoffen könnten mit diesen für ICG bekannten Konzentrationen durchgeführt werden.

Insgesamt ist das Potential der DY-Farbstoffe, auch im Vergleich zu Indocyaningrün, für einen zukünftigen klinischen Einsatz auf dem Gebiet der optischen Bildgebung auf Grund von guten chemischen und fluoro-optischen Eigenschaften und ihrer Bindungsfähigkeit an makromolekulare Biomoleküle als hoch einzuschätzen.

5.3.3 Zytotoxizität der S-Farbstoffe

Im Gegensatz zu den Fluoreszenzfarbstoffen der DY-Serie wurden in den Untersuchungen der **S-Farbstoffe** unterschiedliche Tendenzen hinsichtlich ihrer Zytotoxizität beobachtet.

Nach Behandlung der SVEC 4-10-Zellen und der J 774-Makrophagen mit dem Fluorochrom **S 0121** kam es anfänglich mit fortschreitender Inkubationszeit und ansteigender Farbstoffkonzentration bis 50 μM zu keinem deutlichen Rückgang der Zellvitalität (max. $15 \pm 13 \%$ bzw. $19 \pm 15 \%$) im Ansatz (siehe 4.4.2.3). Die Tendenz bestätigte sich im zweiten Versuch und lässt vermuten, dass S 0121 bis zu dieser Konzentration keine zytotoxische Wirkung auf beide Zellsysteme hatte. Der von dem Ergebnis abweichende Rückgang der Vitalität der Makrophagen bei 10 μM S 0121 und einer Inkubationszeit von 72 Stunden ($85 \pm 19 \%$) kann in Anbetracht der sonst konstanten Resultate als methodischer Fehler bewertet werden. Wie die Struktur zeigt (siehe 3.1.5.3), ist der Farbstoff durch seine im Vergleich zu Indocyaningrün kürzere Polymethinkette und der geringeren Anzahl an aromatischen Ringen ebenfalls hydrophiler als die Referenzsubstanz. Man kann deshalb annehmen, dass dies zu der guten Verträglichkeit bis zu einer Konzentration von 50 μM führte, was die Vermutung für die DY-Farbstoffe untermauert.

Die Behandlung der Endothelzellen mit einer Farbstoffkonzentration von 100 μM S 0121 hatte nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden einen Abfall der Zellvitalität um $37 \pm 8 \%$ bzw. $17 \pm 11 \%$ zur Folge (siehe 4.4.2.3). Bei den Makrophagen kam es in dieser Konzentration zu einem noch deutlicheren zeitabhängigen Rückgang der Zahl lebender Zellen in den Versuchsansätzen (nach 72 Stunden um $81 \pm 3 \%$ bzw. $89 \pm 5 \%$). Es ist zu vermuten, dass die Toleranzschwelle beider Zelllinien bei 100 μM S 0121 im Ansatz überschritten wurde und der exogene Reiz letztendlich zum Zelltod führte. Inwieweit die beobachtete stärkere Zeitabhängigkeit der Vitalität der J 774-Zellen in dieser Konzentration mit einer im Vergleich zu den SVEC 4-10-Zellen höheren zellspezifischen Aufnahme und Anreicherung des Farbstoffes zusammenhängt, könnte auch hier beispielsweise durch eine FACS-Analyse geklärt werden.

Zusammenfassend war in den durchgeführten Versuchen zu erkennen, dass der Cyaninfarbstoff **S 0121** eine geringere zytotoxische Wirkung auf die untersuchten Zelllinien hat als Indocyaningrün. Durch die gute Verträglichkeit des Fluorochroms in klinisch relevanten Konzentrationen und die Stabilität in biologischen Medien sind erste Voraussetzungen für den Einsatz des NIR-Fluoreszenzfarbstoffes in der klinischen Diagnostik gegeben. Die Anwendung des Fluorochroms wäre in der optischen Bildgebung allerdings auf Grund seiner chemischen Struktur eingeschränkt. Das

Farbstoffmolekül besitzt keine Carbonsäuregruppe (siehe 3.1.5.3), welche durch die Aktivierung mit einem Ester kovalent an Proteine gebunden werden kann. Im Gegensatz zu den DY-Farbstoffen ist eine spezifische Bindung von S 0121 an Makromoleküle (zum Beispiel ein Antikörper) und damit der Einsatz des Fluorochroms als Bestandteil optischer Sonden für das *spezifische Targeting* einer gewünschten Zielregion *in vivo* nicht möglich (Wenzel, persönliche Mitteilung). Denkbar wäre allerdings beispielsweise ein Einsatz in fluoro-optischen Untersuchungen wie ophthalmologischen Angiographien.

Im Gegensatz zu dem Farbstoff S 0121 führte die Behandlung beider Zelllinien mit dem Fluorochrom **S 0306** in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration ($p < 0,001$) zu einer merklichen Abnahme der Zellvitalität in den Versuchsansätzen um maximal 100 % (siehe 4.4.2.3). Die schon nach 24 Stunden eingetretene starke zytotoxische Wirkung von S 0306 lässt sich anhand der chemischen Merkmale der Substanz wie folgt erklären: Der Vergleich der Struktur (siehe 3.1.5.1 bis 3.1.5.3) und des Löslichkeitsverhaltens (siehe 3.2.1 und 4.1) aller getesteten Fluoreszenzfarbstoffe zeigt, dass die Hydrophilie beginnend mit den DY-Farbstoffen, über S 0121 und ICG bis hin zu S 0306 abnimmt. Der Farbstoff ist somit der lipophilste der untersuchten Fluorochrome. Die bereits bei Indocyaningrün diskutierten Toxizitätsmechanismen lipophiler Substanzen (siehe 5.3.1) können auch bei der Behandlung der Zellen mit S 0306 zur Abnahme der Zellvitalität geführt haben.

Im Zusammenhang mit der beobachteten starken zytotoxischen Wirkung von S 0306 sind des Weiteren die nicht sulfonierten, aromatischen Doppelringe (Benz-Indole) in der Molekülstruktur des Farbstoffes als problematisch anzusehen und die Tatsache, dass beim Abbau des Fluorochroms die Substanz β -Naphthylamin entstehen kann (Lehmann, persönliche Mitteilung). Das aromatische Amin ist toxisch und kanzerogen (Dekant & Vamvakas, 1994) und könnte auch eine Ursache für den beobachteten Rückgang der Vitalität der SVEC 4-10-Zellen und der J 774-Makrophagen sein.

Insgesamt zeigte sich die von Halle et al. (1991) und Saito et al. (1993) beschriebene Korrelation der Lipophilie einer Substanz mit seiner Zytotoxizität in den Versuchen dieser Studie deutlich an den Farbstoffen Indocyaningrün und S 0306. Das getestete Fluorochrom S 0306 ist lipophiler und wirkte nachweislich zytotoxischer auf die untersuchten Zelllinien als die Referenzsubstanz.

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsversuche mit S 0306 basierten analog zu ICG auf experimentellen Ansätzen, deren Herstellung nur durch ein Anlösen des Farbstoffes in dem organischen Lösungsmittel Dimethylsulfoxid möglich war (siehe 3.2.1). Die mit DMSO zusammenhängende Problematik und die daraus resultierende methodische Vorgehensweise in den Untersuchungen wurde bereits bei Indocyaningrün beschrieben (siehe 5.3.1). In den Versuchsansätzen mit S 0306 lag die Konzentration von DMSO ebenfalls nicht über 0,1 %. Der beobachtete Rückgang der Zellvitalität beider Zelllinien wurde demnach ausschließlich durch die zytotoxische Wirkung des Fluoreszenzfarbstoffes S 0306 hervorgerufen.

Zusammenfassend zeigte das Fluorochrom **S 0306** im Vergleich zu Indocyaningrün, den Farbstoffen der DY-Serie und dem Farbstoff S 0121 in den Zytotoxizitätsversuchen gegenüber den Zellen der SVEC 4-10-Zelllinie und J 774-Zelllinie das höchste toxische Potential. Mögliche Ursachen sind die hohe Lipophilie von S 0306 und farbstoffspezifische Strukturmerkmale und Abbauprodukte. Auf Grund dieser Ergebnisse ist der klinische Einsatz des Fluorochroms nur in geringsten Konzentrationen vorstellbar. Sind diese für die optische Bildgebung nicht ausreichend, sollte auf eine *in vivo* Anwendung des Farbstoffes gänzlich verzichtet werden. Hinzu kommt, dass das Fluorochrom S 0306 analog zu S 0121 nicht kovalent an makromolekulare Biomoleküle gebunden werden kann (keine Carbonsäuregruppe). Dies würde einen klinischen Einsatz weiter einschränken.

Durch die *in vitro* Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnten Kenntnisse über die Stabilität neuer NIR-Fluoreszenzfarbstoffe in biologischen Medien und die zytotoxische Wirkung der Fluorochrome auf ihr biologisches Umfeld erlangt werden. Die Voraussetzungen für eine potentielle klinische Anwendung in der optischen Bildgebung sind hinsichtlich der untersuchten Eigenschaften für die getesteten Vertreter der DY-Serie und auch für den Farbstoff S 0121 gegeben.

6 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden *in vitro* Studie wurden neue potentielle Nah-Infrarot-Fluoreszenzfarbstoffe für die optische Bildgebung erstmals hinsichtlich ihrer Stabilität in Lösung und ihrer Zytotoxizität untersucht.

Die getesteten Fluorochrome der DY-Serie, S-Serie und CY-Serie sind Cyaninfarbstoffe auf Polymethin-Basis und strukturell mit dem klinisch bereits etablierten und hier als Referenzsubstanz ebenfalls untersuchten Indocyaningrün (ICG) verwandt. Ihre Absorptions- und Emissionsmaxima liegen in dem für die diagnostische Anwendung vielversprechenden, fernen roten bzw. nah-infraroten Wellenlängenbereich (650 - 1000 nm).

Mit den hier erstmals untersuchten Vertretern der **DY-Serie** (DY-681, DY-731, DY-751, DY-776) wurden Fluoreszenzfarbstoffe charakterisiert, die sich im Vergleich zu Indocyaningrün durch eine höhere Stabilität in wässriger Lösung (PBS und Kulturmedium mit 10 % FKS) und eine weitaus geringere zytotoxische Wirkung auf ausgesuchte Zelllinien (SVEC 4-10-Zellen und J 774-Zellen) auszeichnen.

Die Ergebnisse begründen sich auf verbesserte physiko-chemische Eigenschaften der Fluorochrome, im speziellen auf ihren hydrophilen Charakter. Neben ebenfalls verbesserten fluoro-optischen Merkmalen haben die DY-Farbstoffe gegenüber dem klinisch bereits etablierten Fluorochrom ICG den entscheidenden Vorteil, dass sie kovalent an makromolekulare Biomoleküle gebunden werden können. Dadurch sind sie für einen Einsatz als signalgebender Bestandteil optischer Sonden und damit zur Markierung von organischen und anorganischen Mikropartikeln in verschiedensten optischen, insbesondere fluoreszenzoptischen, Bestimmungs- und Nachweisverfahren geeignet. Ihre Anwendung als Kontrastmittel in der optischen Bildgebung ist demzufolge und wegen der daraus resultierenden vielfältigen potentiellen Einsatzmöglichkeiten wahrscheinlich von großem diagnostischem Nutzen.

Die hier durchgeführten *in vitro* Experimente sind ein erster Schritt auf dem Weg zu der langfristig angestrebten klinischen Zulassung dieser neuen NIR-Fluorochrome.

In einem zukünftigen Forschungsabschnitt muss weiterhin geklärt werden, wie sich die Farbstoffe in klinisch relevanten, und für die erfolgreiche Anwendung in der optischen Bildgebung notwendigen, Konzentrationen im lebenden Organismus verhalten. Durch *in vivo* Versuche an Kleintieren und sich daran anschließende klinische Studien wird es möglich sein, die DY-Farbstoffe noch detaillierter und umfassender zu charakterisieren und die gewonnenen Erkenntnisse für einen zukünftigen routinierten klinischen Einsatz der Fluorochrome zu nutzen.

Der Cyaninfarbstoff **CY 5.5** wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals hinsichtlich seiner *in vitro* Stabilität in wässrigem Milieu untersucht. Auf Grund seines stark hydrophilen Charakters zeigte er sich unter den festgelegten Versuchsbedingungen erwartungsgemäß von allen getesteten NIR-Fluoreszenzfarbstoffen am stabilsten. Seine eventuell zytotoxische Wirkung muss in weiterführenden Studien untersucht werden.

Die hier durchgeführten Experimente zeigten weiterhin, dass der diagnostische Einsatz des Fluorochroms **S 0121** wegen seiner geringen Zytotoxizität in klinisch relevanten Konzentrationen auf das hier untersuchte biologische Material *in vitro* und der Stabilität in Lösung unter *in vivo* nahen Bedingungen (Kulturmedium, 37 °C) ebenfalls vorstellbar ist. Ein *spezifisches optisches Targeting* von Zielmolekülen und Zielgeweben kann mit S 0121 jedoch nicht realisiert werden, da die dafür notwendige kovalente Bindung des Farbstoffes an makromolekulare Biomoleküle strukturell nicht funktioniert. Diagnostische Anwendungsmöglichkeiten des Fluorochroms sind allerdings in fluoreszenzoptischen Untersuchungen wie beispielsweise ophthalmologischen Angiographien denkbar.

Der Farbstoff **S 0306** ist von allen getesteten Fluorochromen dieser Arbeit der lipophilste. Auf Grund seiner physiko-chemischen Eigenschaften war er in Lösung weniger stabil als die Referenzsubstanz Indocyaningrün. Ferner zeigte er in Abhängigkeit von äußeren Parametern die höchste Zytotoxizität auf die Vitalität der untersuchten Zelllinien (bis zu 100 % ab Konzentrationen von 10 µM). Ursachen hierfür sind neben dem lipophilen Charakter, farbstoffspezifische Strukturmerkmale und Abbauprodukte. Als Konsequenz aus diesen Ergebnissen ist eine klinische Anwendung von S 0306 unwahrscheinlich.

7 Literaturverzeichnis

1. Abels C, Karrer S, Bäuml W, Goetz AE, Landthaler M and Szeimies RM (1998)
Indocyanine green and laser light for the treatment of AIDS-associated cutaneous Kaposi's sarcoma.
Br J Cancer 77:1021-4
2. Abels C, Fickweiler S, Weiderer P, Bäuml W, Hofstadter F, Landthaler M and Szeimies RM (2000)
Indocyanine green (ICG) and laser irradiation induce photo-oxidation.
Arch Dermatol Res 292(8):404-11
3. Amersham (2003)
Datasheet Fluorolink™ CY 5.5 Monofunctional Dye, 5 Pack
Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
4. Aubrecht J and Perlik F (1990)
[The effect of the method of detecting indocyanine green (HPLC, spectrophotometry) on the determination of pharmacokinetic parameters.]
Cesk Farm 39:155-7
5. Baker KJ (1966)
Binding of sulfobromophthalein (BSP) sodium and indocyanine green (ICG) by plasma alpha 1 lipoproteins.
Proc Soc Exp Biol Med 122:957-963
6. Ballou B, Fisher GW, Waggoner AS, Farkas DL, Reiland JM, Jaffe R, Mujumdar RB, Mujumdar SR and Hakala TR (1995)
Tumor labeling in vivo using cyanine-conjugated monoclonal antibodies.
Cancer Immunol Immunother 41:257-263

7. Bäumler W, Abels C, Karrer S, Weiß T, Messmann H, Landthaler M and Szeimies RM (1999)
Photo-oxidative killing of human colonic cancer cells using indocyanine green and infrared light.
Br J Cancer 80:360-3
8. Beauvoit B, Kitai T and Chance B (1994)
Contribution of the Mitochondrial Compartment to the Optical Properties of the Rat Liver: A Theoretical and Practical Approach.
Biophysical Journal 67:2501-2510
9. Becker A, Hessenius C, Licha K, Ebert B, Sukowski U, Semmler W, Wiedenmann B and Grötzinger C (2001)
Receptor-targeted optical imaging of tumors with near-infrared fluorescent ligands.
Nature Biotechnology 19:327-331
10. Benson RC and Kues HA (1978)
Fluorescence properties of indocyanine green as related to angiography.
Phys Med Biol 23:159-163
11. Bradley EC and Barr JW (1968)
Determination of blood volume using indocyanine green (cardio-green) dye.
Life Sci 7:1001-1007
12. Bremer C, Ntziachristos V, Mahmood U, Tung CH und Weissleder R (2001)
Fortschritte in der optischen Bildgebung.
Der Radiologe 41:131-137
13. Brooker LG (1955)
Some recent developments in the chemistry of photographic sensitizing dyes.
Experientia Suppl 2:229-257

14. Cascorbi I and Foret M (1991)
Interactions of xenobiotics on the glucose transport system and Na⁺/K⁺-ATPase of human skin fibroblasts.
Ecotoxicol Environm Saf 21:38-46
15. Cherrick GR, Stein SW, Leevy CM and Davidson CS (1960)
Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay and hepatic extraction.
J Clin Invest 39:592-600
16. Conrad T (2001)
molecular imaging – medizinische Bildgebung der nächsten Generation.
Hausarbeit zur Vorlesung "Medizinische Informatik"
Im WS 2001/02 an der FU Berlin
17. Czerney P, Lehmann F, Wenzel M, Seidel M und Gauglitz G (2001)
Anwendungen neuer diodenlaserkompatibler Fluoreszenzmarker in der Bioanalytik.
Poster vorgestellt auf dem 2. Biosensor Symposium in Tübingen
18. Dekant W und Vamvakas S: Toxikologie für Chemiker und Biologen.
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford (1994) S. 252
19. Desmettre T, Devoisselle JM and Mordon S (2000)
Fluorescence Properties and Metabolic Features of Indocyanine Green (ICG) as related to Angiography.
Survey of Ophthalmology, Vol.45, 1:15-25
20. Dyomics GmbH (2000)
Stabile NIR-Marker-Farbstoffe auf der Basis von Benzopyrylium-Polymethinen.
Offenlegungsschrift DE 100 25 820 A1
21. FEW Chemicals GmbH (2003)
Analysenzertifikat (EN 10204-2.3) S 0270

22. FEW Chemicals GmbH (2003)
Analysenzertifikat (EN 10204-2.3) S 0121

23. FEW Chemicals GmbH (2003)
Analysenzertifikat (EN 10204-2.3) S 0306

24. Fickweiler S, Szeimies RM, Bäuml W, Steinbach P, Karrer S, Goetz AE, Abels C, Hofstadter F and Landthaler M (1997)
Indocyanine green: intracellular uptake and phototherapeutic effects in vitro.
J Photochem Photobiol B 38(2-3):178-83

25. Fox IJ, Brooker LG, Heseltine DW and Wood EH (1956)
A new dye for continuous recording of dilution curves in whole blood independent of variations in blood oxygen saturation.
Circulation 14:937-8

26. Fox IJ, Brooker LG, Heseltine DW, Essex HE and Wood EH (1957)
A tricarbocyanine dye for continuous recording of dilution curves in whole blood independent of variations in blood oxygen saturation.
Proc Mayo Clin 32:478

27. Gandorfer A, Haritoglou C, Gandorfer A and Kampik A (2003)
Retinal Damage from Indocyanine Green in Experimental Macular Surgery.
IOVS, Vol.44, 1:316-323

28. Gathje J, Steuer RR and Nicholes KR (1970)
Stability studies on indocyanine green dye.
J Appl Physiol 29:181-185

29. Gopinath SP, Robertson CS, Grossman RG and Chance B (1993)
Near-infrared spectroscopic localization of intracranial hematomas.
J Neurosurg 79:43-47

30. Haglund MM, Berger MS and Hochman DW (1996)
Enhanced Optical Imaging of Human Gliomas and Tumor Margins.
Neurosurgery, Vol.38, 2:308-315

31. Halle W, Baeger I, Ekwall B and Spielmann H (1991)
Correlation between in vitro cytotoxicity and octanol/water partition of 29
substances from the MEIC program.
ATLA 19:338-343

32. Hansch A, Frey O, Hilger I, Sauner D, Haas M, Schmidt D, Kurrat C, Gajda M,
Malich A, Bräuer R and Kaiser W (2004)
Diagnosis of Arthritis Using Near-Infrared-Fluorochrome Cy 5.5.
Invest Radiol 39:626-632

33. Hilger I (2003)
Persönliche Mitteilung
Arbeitsgruppe Experimentelle Radiologie, Institut für Diagnostische und
Interventionelle Radiologie
Klinikum der FSU Jena, Erlanger Allee 101, 07740 Jena

34. Ho JD, Tsai RJ, Chen SN and Chen HC (2003)
Cytotoxicity of indocyanine green on retinal pigment epithelium: implications for
macular hole surgery.
Arch Ophthalmol 121(10):1423-9

35. Hollins B, Noe B and Henderson JM (1987)
Fluorometric determination of indocyanine green in plasma.
Clin Chem 33:765ff.

36. Holzer W, Mauerer M, Penzkofer A, Szeimies RM, Abels C, Landthaler M and
Bäumler W (1998)
Photostability and thermal stability of indocyanine green.
J Photochem Photobiol B 47:155-164

37. Horak ER, Leek R, Klenk N, Lejeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniewska K and Harris AL (1992)
Angiogenesis, assessed by platelet/ endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer.
Lancet 340:1120-1124

38. Intes X, Ripoll J, Chen Y, Nioka S, Yodh AG and Chance B (2003)
In vivo continuous-wave optical breast imaging enhanced with Indocyanine Green.
Medical Physics, Vol.30, 6:1039-1047

39. Klocke FJ, Greene DG and Koberstein RC (1968)
Indicator-dilution measurement of cardiac output with dissolved hydrogen.
Circ Res 22:841-853

40. Klotz IM Protein interactions.
In: Neurath H and Bailey K (eds.): The proteins.
Academic Press, New York (1953), Vol.1, part B, p.727-806

41. Landsman ML, Kwant G, Mook GA and Zijlstra WG (1976)
Light-absorbing properties, stability and spectral stabilization of indocyanine green.
J Appl Physiol 40:575-583

42. Lee JE, Yoon TJ, Oum BS, Lee JS and Choi HY (2003)
Toxicity of indocyanine green injected into the subretinal space: subretinal toxicity of indocyanine green.
Retina 23(5):675-81

43. Leevy CM, Smith F, Longueville J, Paumgartner G and Howard MM (1967)
Indocyanine green clearance as a test for hepatic function. Evaluations by dichromatic ear densitometry.
JAMA 200:236-40

44. Lehmann F (2003)
Persönliche Mitteilung
Dyomics GmbH, Winzerlaer Strasse 2, 07745 Jena

45. Licha K, Riefke B, Ntziachristos V, Becker A, Chance B and Semmler W (2000)
Hydrophilic Cyanine Dyes as Contrast Agents for Near-infrared Tumor Imaging:
Synthesis, Photophysical Properties and Spectroscopic In vivo Characterization.
Photochemistry and Photobiology 72(3):392-398

46. Lin Y, Weissleder R and Tung CH (2003)
Synthesis and Properties of Sulfhydryl-Reactive Near-Infrared Cyanine
Fluorochromes for Fluorescence Imaging.
Molecular Imaging Vol.2, 2:87-92

47. Lindl T: Zell- und Gewebekultur.
4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin (2000)
S. 57-59, 98, 110 und 190

48. Lindl T (2005)
Persönliche Mitteilung
Institut für angewandte Zellkultur,
Dr. Toni Lindl GmbH, Balanstrasse 6, 81669 München

49. Luty GA (1978)
The acute intravenous toxicity of biological stains, dyes and other fluorescent
substances.
Toxicol Appl Pharmacol 44:225-249

50. Mahmood U, Tung CH, Bogdanov A and Weissleder R (1999)
Near-Infrared Optical Imaging of Protease Activity for Tumor Detection.
Radiology 213:866-870

51. Mc Hale AP and Mc Hale L (1988)
Use of a tetrazolium based colorimetric assay in assessing photoradiation therapy
in vitro.
Cancer Lett 41:315-321

52. Meijer DKF, Weert B and Vermeer GA (1988)
Pharmacokinetics of biliary excretion in Man. VI. Indocyanine green.
Eur J Clin Pharmacol 35:295-303

53. Moody ED, Viskari PJ and Colyer CL (1999)
Non-covalent labeling of human serum albumin with indocyanine green:
a study by capillary electrophoresis with diode laser-induced fluorescence
detection.
Journal of Chromatography B 729:55-64

54. Muckle TJ (1976)
Plasma protein binding of indocyanine green.
Biochem Med 15:17-21

55. Mustroph H (2003)
Persönliche Mitteilung
FEW Chemicals GmbH Wolfen,
Chemie-Park Bitterfeld-Wolfen, Technikumstrasse 1, 06766 Wolfen

56. Nioka S, Moser D, Lech G, Evengelisti M, Verde T, Chance B and Kuno S (1998)
Muscle deoxygenation in aerobic and anaerobic exercise.
Adv Exp Med Biol 454:63-70

57. Ntziachristos V, Yodh AG, Schnall M and Chance B (2000)
Concurrent MRI and diffuse optical tomography of breast after indocyanine green
enhancement.
PNAS Vol.97, 6:2767-2772

58. O'Connell KA and Edidin M (1990)
A mouse lymphoid endothelial cell line immortalized by simian virus 40 binds lymphocytes and retains functional characteristics of normal endothelial cells.
J Immunol 144:521-525
59. Oswald B, Patsenker L, Duschl J, Szmazinski H, Wolfbeis OS and Terpetschnig E (1999)
Synthesis, Spectral Properties, and Detection Limits of Reactive Squaraine Dyes, a New Class of Diode Laser Compatible Fluorescent Protein Labels.
Bioconjug Chem 10:925-931
60. Penzkofer A (2005)
Persönliche Mitteilung
Institut für Experimentelle und Angewandte Physik, Universität Regensburg,
Universitätsstrasse 31, 93053 Regensburg
61. Promega (1999)
CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay.
Technical Bulletin No.245
Promega Corporation, 2800 Woods Hollow Road, Madison WI 53711-5399, USA
62. Pschyrembel W: Klinisches Wörterbuch.
258. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, New York (1998) S. 363
63. Ralph P and Nakoinz I (1975)
Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumor and its cloned cell line.
Nature 257:393-394
64. Reynolds JS, Troy TL, Mayer RH, Thompson AB, Waters DJ, Cornell KK, Snyder PW and Sevic-Muraca EM (1999)
Imaging of Spontaneous Canine Mammary Tumors Using Fluorescent Contrast Agents.
Photochemistry and Photobiology 70(1):87-94

65. Rick W: Klinische Chemie und Mikroskopie.
3. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1974) S. 158
66. Riefke B, Licha K and Semmler W (1996)
In vivo characterization of cyanine dyes as contrast agents for
near-infrared imaging.
SPIE Vol.2927:199-208
67. Sachs L: Angewandte Statistik.
7.Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1992) S.161
68. Saito H, Koyasu J, Yoshida K, Shigeoka T and Koike S (1993)
Cytotoxicity of 109 chemicals to goldfish GFS cells and relationships with
1-octanol/water partitions coefficients.
Chemosphere 26:1015-1028
69. Saxena V, Sadoqi M and Shao J (2003)
Degradation Kinetics of Indocyanine Green in Aqueous Solution.
Journal of Pharmaceutical Sciences Vol.92, 10:2090-97
70. Sevick EM, Chance B, Leigh J, Nioka S and Maris M (1991)
Quantitation of Time- and Frequency-Resolved Optical Spectra for the
Determination of Tissue Oxygenation.
Analytical Biochemistry 195:330-351
71. Szeimies RM (1994-1997)
7. Forschungsbericht der Universität Regensburg,
Mechanismen der Photodynamischen Therapie. Einsehbar unter:
<http://www.uni-regensburg.de/Universitaet/Forschungsbericht/Med/derma/prof4.html>
72. Tong Z, Singh G and Rainbow AJ (2001)
Extreme Dark Cytotoxicity of Nile Blue A in Normal Human Fibroblasts.
Photochemistry and Photobiology 74(5):707-711

73. Tung CH, Bredow S, Mahmood U and Weissleder R (1999)
Preparation of a cathepsin D sensitive near-infrared fluorescence probe for imaging.
Bioconjug Chem 10:892-896
74. Vaupel P, Thews O und Hoeckel M (1997)
Durchblutung, Oxygenierung, pH-Verteilung und bioenergetischer Status maligner Tumoren.
Arzneimitteltherapie, 15. Jahrgang, Heft 10:319-327
75. Vaupel P, Thews O, Kelleher DK and Hoeckel M (1998)
Current status of knowledge and critical issues in tumor oxygenation.
Results from 25 years research in tumor pathophysiology.
Adv Exp Med Biol 454:591-602
76. Villringer A & Chance B (1997)
Non-invasive optical spectroscopy and imaging of human brain function.
Trends Neurosci 20:435-442
77. Weissleder R and Mahmood U (2001)
Molecular Imaging.
Radiology 219:316-333
78. Weissleder R, Tung CH, Mahmood U and Bogdanov A (1999)
In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes.
Nature Biotechnology Vol.17:375-378
79. Wenzel M (2004)
Persönliche Mitteilung
Dyomics GmbH, Winzerlaer Strasse 2, 07745 Jena

80. Zeeck A, Eick S, Krone B und Schröder K: Chemie für Mediziner.
Verlag Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore (1992) S.197
81. Zhou JF, Chin MP and Schafer SA (1994)
Aggregation and degradation of indocyanine green.
SPIE Proc Ser 2128:495-505

8 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Professor Dr. med. Dipl. chem. Werner A. Kaiser für die freundliche Aufnahme am Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie.

Besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau PD Dr. rer. biol. hum. Ingrid Hilger für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung und die konstruktive Kritik bei dieser Arbeit und für ihre Ermutigungen, dass gesteckte Ziel immer im Auge zu behalten.

Großen Dank möchte ich weiterhin den Kollegen der Firma Dyomics GmbH Jena, besonders Herrn Dr. rer. nat. habil. Peter Czerney, Herrn Dr. rer. nat. Frank Lehmann und Herrn Dr. rer. nat. Matthias Wenzel, für die Bereitstellung der Farbstoffe der DY-Serie sowie ihre fortwährende Unterstützung und hervorragende Zusammenarbeit, insbesondere bei der Klärung chemischer Sachverhalte, aussprechen.

In diesem Zusammenhang sei auch der Firma FEW Chemicals, Wolfen, im Speziellen Herrn Dr. rer. nat. Heinz Mustroph, sowohl für die Farbstoffe der S-Serie und das Indocyaningrün als auch für die hilfreichen Tipps und Ratschläge am Telefon gedankt.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. rer. nat. Rüdiger Vollandt für seine große Geduld und Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse.

Abschließend möchte ich mich bei dem lieben Laborteam (Frau Dr. Fritsche, Frau Maron und Frau Heyne) für die gute Zusammenarbeit, allen meinen Freunden, besonders Euch, Christiane, Wieland, Liane und Matthias, für den Zuspruch und die Hilfe und bei meinen Eltern und Großeltern für ihren moralischen Beistand und die finanzielle Unterstützung bedanken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Haag
Vorname: Romy
geboren am: 19.09.1977
geboren in: Sonneberg/Thüringen
Familienstand: ledig
Eltern: Haag, Roland (Diplom-Maschinenbauingenieur)
Haag, Heidemarie (Diplom-Maschinenbauingenieur)

Bildungsweg

1984-1991 August-Bebel-Oberschule in Sonneberg/Thüringen
1991-1996 2. Staatliches Gymnasium in Sonneberg/Thüringen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1997 Beginn des Zahnmedizinstudiums an der
„Friedrich-Schiller-Universität“ in Jena/Thüringen
2000 Zahnärztliche Vorprüfung
2002 Staatsexamen
2003 Arbeit an Promotion aufgenommen
Thema: Neue potentielle NIR-Fluoreszenzfarbstoffe zur
optischen Bildgebung: Charakter, Stabilität und Zytotoxizität

Berufstätigkeit

2004 Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis Dr. Fuchs
in Alzenau/Hörstein, Bayern
2004/05 Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis Dr. Strauch
in Hainburg/Kleinkrotzenburg, Hessen
2005 Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis Dr. Nolte
in Frammersbach, Bayern

Publikationen

Hilger I, Haag R, Czerney P, Wenzel M, Hansch A, Fritsche C and Kaiser WA(2004)
Charakterisierung von Nah-Infrarot fluoreszierenden Farbstoffen für die *in vivo*-
Applikation.
Fortschr Röntgenstr 176:DOI:10.1055/s-2004-827957

Schöllkrippen, den 15.11.05

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. I. Hilger,

die Hilfe des Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und das Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers
